Biotechnologie-Forscher

DNA-Fingerprinting-Kit

Anleitung

Bestellnummer
166-0007-EDU

www.explorer.bio-rad.com

Lyophilisierte Reagenzien können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Lagern Sie die DNA-Marker bei 4°C oder kälter innerhalb von 4 Wochen nach Lieferung.

Wie können DNA-Bandenmuster bei der Lösung menschlicher Probleme helfen?

DNA-Fingerprinting wird nun routinemäßig bei der Aufklärung von Verbrechen eingesetzt. In den vergangenen Jahren gab es neue Berichte, wie mit kleinsten Mengen DNA einerseits Individuen identifiziert wurden, die in Vorfälle verwickelt waren, die sogar Jahre zurücklagen, andererseits Unschuldige von Anschuldigungen entlastet werden konnten.
Die Schüler sind begeistert davon, wie DNA zur Identifizierung von Individuen eingesetzt werden kann. Dieser Versuch ermöglicht eine Vertiefung des Stoffes, wie Restriktionsenzyme die DNA schneiden, wie Elektrophorese zur Auftrennung und zum sichtbar machen von DNA-Fragmenten eingesetzt wird und wie diese Techniken zu einem DNA-Fingerprint kombiniert werden können. Die Prinzipien der Restriktionsanalyse, des Plasmid-Mappings und der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten können mit diesem Kit auch dokumentiert werden.
Eröffnen Sie eine Diskussion um wissenschaftliche, ethische und rechtliche Aspekte des DNA-Profilings. DNA-Fingerprinting wird eingesetzt, sowohl in medizinischen und forensischen Anwendungen, als auch in Vaterschaftstests, um die genetischen Beziehungen zwischen Individuen auf molekularer Ebene darzustellen. Dieser Kit ermöglicht es den Schülern in die Rolle eines forensischen Wissenschaftlers zu schlüpfen und einen positiven ID durchzuführen. Ganz konkret bedeutet das, die Schüler simulieren einen Fall, wobei sie echte DNA als Beweis einsetzen und selbst herausfinden, wer der Täter war.
Im Rahmen dieses Versuchs analysieren die Schüler sechs verschiedene Plasmid-DNA-Proben. Eine dieser Proben von einem hypothetischen „Tatort" eines Verbrechens und fünf Proben von „Verdächtigen" werden mit zwei Restriktionsenzymen verdaut. Die dabei entstandenen DNA-Fragmente werden mit einem Agarosegel aufgetrennt und mit der Bio-Rad Fast Blast DNA-Färbelösung sichtbar gemacht. Nach Analyse der Muster der Restriktionsverdaus vergleichen die Schüler die Beweise und ordnen dann die DNA eines Verdächtigen der am Tatort gefundenen DNA-Probe zu.
Als Alternative zur klassischen Anwendung dieses Kits im Rahmen der Gerichtsmedizin, können sich die Schüler vorstellen, sie wären High Tech Pathologen, die das Ausbrechen einer zum ersten Mal aufgetretenen, gefährlichen Infektionskrankheit untersuchen. Das Zentrum zur Kontrolle und Prevention von Krankheiten vermutet, daß ein neuer Bakterienstamm aufgetreten ist, der nicht nur eine neue Krankheit verursacht, sondern auch verschiedene Resistenzplasmide von einigen anderen Bakterienstämmen übernommen hat. Ihre Aufgabe ist es nun, eine DNA Diagnose aufzubauen, die die schuldigen Plasmide identifiziert. Sie entscheiden sich, die Analyse mit Restriktionsenzymen und „DNA Fingerprinting mittels Elektrophorese" einzusetzen, um verschiedene verdächtige Plasmide zu identifizieren und zu unterscheiden und ihre Verbreitung nachvollziehen zu können. DNA aus Kulturen einer Reihe betroffener Patienten wurde isoliert. Können die Schüler den neuen Killer identifizieren, ehe das Pathogen die Bevölkerung befällt und eine wahre Epidemie auslöst!

Wir bemühen uns, unseren Lehrplan und unsere Produkte ständig zu verbessern. Wir freuen uns über Ihre Anmerkungen, Kommentare und Vorschläge!

Ron Mardigian
Dr. Patti Taranto
Bio-Rad Laboratories
ron_mardigan@bio-rad.com
patti_taranto@bio-rad.com
1-800-424-6723

Inhaltsverzeichnis

Überblick für den Lehrer

Zielgruppe

Dieser Versuch ist für alle Schüler der Mittel- und der Oberstufe geeignet, unabhängig von ihrem Wissensstand bezüglich der Chemie der Nukleinsäuren.

Zielsetzungen für die Schüler

Alle Schüler, die an diesem Experiment teilnehmen, sollten:

1. von dieser Aufgabe gefordert werden und ihr Interesse an der Untersuchungsmethode sollte geweckt werden.
2. ein Verständnis für einige der wissenschaftlichen Grundlagen entwickeln, die beim DNA-Fingerprinting eine Rolle spielen.
3. Beweise gegeneinander abwägen können und in der Lage sein, die in diesem Experiment gewonnenen Daten klar zu analysieren und zu interpretieren.
4. die bei wissenschaftlichen Arbeiten auftretenden Gedankenprozesse nachvollziehen können.
5. Neugierde und Vertrauen in ihre Fähigkeit entwickeln, sich mit weiteren wissenschaftlichen Fragen und Themen auseinanderzusetzen.

Unterrichtsstrategien

Dieser Lehrplan soll eine gerichtsmedizinische Untersuchung simulieren, kann aber auch für eine breite Palette anderer Anwendungen genetischer Analysen eingesetzt werden. Die Auswahl des tatsächlich genutzten Anwendungsgebietes bleibt der Lehrkraft überlassen. (Siehe alternative Anwendungsgebiete in Anhang A).

Bei diesem Experiment sollen Schüler durch eigene Analyse den Entdeckungsprozeß nachvollziehen können, sowie bei jedem einzelnen Schritt die für die Methode und die Datenanalyse wichtigen Konzepte verstehen lernen. Wir hoffen, mit diesem Versuch möglichst vielen Schülern das Verständnis zu erleichtern (und eine höhere Erfolgsquote zu erreichen, als wenn die Lehrkraft alle Hintergrundinformationen vermittelt). Indem es der Lehrkraft ermöglicht wird, den Fortschritt und Kenntnisstand der einzelnen Gruppen zu überprüfen, können die Schüler in gewissen Grenzen ihre Lerngeschwindigkeit selbst bestimmen. Wir haben festgestellt, daß dieser Ansatz einer größeren Anzahl von Schülern mit unterschiedlichem Kenntnisstand ermöglicht, die oben beschriebenen Lernziele zu erreichen.

Sicherheitsfragen

Essen, Trinken, Rauchen und Verwendung von Kosmetika sind in Arbeitsbereich nicht erlaubt. Es wird dringend empfohlen Schutzbrillen und Handschuhe zu tragen. Die Schüler sollten ihre Hände vor und nach diesem Versuch mit Seife waschen. Falls ein Schüler irgendeine der Lösungen ins Auge bekommt, soll das Auge sofort 15 Minuten lang mit Wasser gespült werden. Obwohl der Fast Blast DNA-Farbstoff nicht toxisch ist, sollten Latex- oder Vinylhandschuhe während des Arbeitens mit dem Farbstoff getragen werden, damit die Hände nicht gefärbt werden. Es wird empfohlen, Laborkittel oder andere Schutzkleidung zu tragen, um zu verhindern, dass die Kleidung gefärbt wird.

Lagerungstemperaturen

Der Kit wird in zwei Modulen verpackt und verschickt. **Bitte öffnen Sie die Module sofort nach Erhalt** und lagern Sie die einzelnen Bestandteile bei -20°C, 4°C oder bei Raumtemperatur wie angezeigt.

Zeitplan für die Durchführung*:

Zu diesem Fingerprinting Lehrplan gehören vier Unterrichtsstunden. Alle Unterrichtspläne sind so angelegt, dass sie innerhalb von 50 Minuten durchgeführt werden können. Alle Unterrichtspläne beinhalten:

- Eine Reihe von Überlegungen, die die Schüler vor der eigentlichen Durchführung des Experiments anstellen sollten.
- Eine von den Schülern aktiv durchzuführende Untersuchung.
- Fragen zur Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.

Unterrichtsstunde 1:	**Einführung in das DNA-Fingerprinting**
Aktivität	Vortrag und Diskussion Vorüberlegung zu Experiment 1 und 2
Unterrichtsstunde 2:	**Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen**
Aktivität	Agarosegele gießen, DNA-Proben verdauen Vollständige Voranalyse und Beantwortung der Fragen
Unterrichtsstunde 3:	**Elektrophorese der DNA-Proben**
Aktivität	Beladen der Gele und Durchführung der Elektrophorese Färben der Gele (Protokollieren der Ergebnisse und Trocknen der Gele, wenn das Kurz-Färbe-Protokoll verwendet wird) Vollständige Auswertung der Ergebnisse und Beantwortung der Fragen
Unterrichtsstunde 4:	**Analyse und Interpretation der Ergebnisse**
Aktivität	Protokollieren der Ergebnisse und Trocknen der Gele (wenn das Über-Nacht-Protokoll verwendet wird) Auswertung der Ergebnisse Fragen zur Durchführung der Analyse Generieren einer Standardkurve Diskutieren der Ergebnisse und Abwägen der Beweiskraft

Der Lehrplan für diesen Versuch wurde entwickelt in Zusammenarbeit mit:

Len Poli und Russ Janigian
S.F. Base – Biotechnologieprogramm
San Francisco

*Die oben erwähnten Labortätigkeiten (Unterrichtsstunde 2-4) können auch innerhalb eines 3-Stunden-Einzelblocks durchgeführt werden.

Kit-Inhalt Checkliste (✓)

In diesem Kit enthaltene Komponenten	**Mengen pro Kit**	**(✓)**
1. Tatort-DNA (TO) DNA mit Puffer, lyophilisiert, 60 µg	1 Fläschchen	❑
2. Verdächtiger 1 (V1) DNA mit Puffer, lyophilisiert, 60 µg	1 Fläschchen	❑
3. Verdächtiger 2 (V2) DNA mit Puffer, lyophilisiert, 60 µg	1 Fläschchen	❑
4. Verdächtiger 3 (V3) DNA mit Puffer, lyophilisiert, 60 µg	1 Fläschchen	❑
5. Verdächtiger 4 (V4) DNA mit Puffer, lyophilisiert, 60 µg	1 Fläschchen	❑
6. Verdächtiger 5 (V5) DNA mit Puffer, lyophilisiert,60 µg	1 Fläschchen	❑
7. E*co*RI/P*st*I Restriktionsenzymmischung, lyophilisiert, 1800 units	1 Fläschchen	❑
8. Steriles Wasser, 2,5 ml	1 Fläschchen	❑
9. Lambda *Hind*III Verdau (DNA-Marker), 0,2 µg/µl, 100 µl	1 Fläschchen	❑
10. Anfärbemittel für DNA-Probe	1 Fläschchen	❑
11. Fast Blast DNA-Färbelösung, 500x, 100 ml	1 Fläschchen	❑
12. Reaktionsgefäße, 1,5 ml, verschiedene Farben	60	❑
13. Farblose Reaktionsgefäße	30	❑
14. Agarose, 5 g	1	❑
15. Elektrophorese Puffer, 50x TAE, 100 ml	1	❑
16. Styroporständer für Reaktionsgefäße	16	❑
17. Schalen zum Anfärben der Gele	10	❑

Benötigtes Zubehör, das nicht in diesem Kit enthalten ist	**Anzahl pro Klasse**	**(✓)**
Einstellbare Mikropipette, 2-20 µl (# 166-0506EDU)	1-8	❑
Pipettenspitzen 1 Box, 5 Racks zu 200 (# 223-9338EDU)	1	❑
Horizontale Elektrophoresekammer (# 166-4000EDU)	1-8	❑
Netzgerät PowerPac Basic (#164-5050EDU) oder PowerPac Junior (# 165-5048EDU)	1-2	❑
Einstellbare Mikropipette, 20-200 µl (# 166-0509EDU)	1-8	❑
Einstellbare Mikropipette, 100-1000 µl (# 166-0508EDU)	1-8	❑
Pipettenspitzen, 100-1000 µl, 5 Racks zu 200 (# 223-9350EDU)	1	❑
Filzschreiber	1	❑
Mikrowellenofen oder heiße Platte	1	❑
Destilliertes Wasser	1	❑
250 ml Erlenmeyerkolben zum Erhitzen der Agarose	1	❑
500 ml Kolben oder Becher zum Verdünnen des DNA-Farbstoffes	1	❑
Kübel mit Eis	1	❑
Laborband (nicht Marke Scotch 3M oder ein ähnliches Band)	1	❑

Optionales Zubehör	**Anzahl pro Klasse**	**(✓)**
37°C Wasserbad (# 166-0504EDU) oder Mini-Inkubationsofen (# 166-0501EDU)	1	❑
Gel Support Film, 50 Blatt, (# 170-2984EDU)	1	❑
Mikrozentrifuge (# 166-0612EDU) oder Mini-Zentrifuge (# 166-0613EDU)	1	❑

Hintergrundinformation für die Lehrkraft

Einführung

Angestellte in gerichtsmedizinischen Labors werden oft im Rahmen der Indizienanalyse bei Strafverfolgungen und anderen Anwendungen gebeten, ein DNA-Profil bzw. einen DNA-Fingerabdruck zu erstellen[1]. DNA Fingerprinting könnte zusätzlich eine Anreicherung durch die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR[2]) erforderlich machen, um auch kleine Mengen DNA analysieren zu können, bzw. eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (restriction fragment length polymorphism, RFLP[3]), wenn große Mengen DNA vorliegen. Ein Schritt in der RFLP Analyse mit menschlichem Material erfordert den Vergleich von Bandenmuster, die fragmentierte DNA-Proben nach Auftrennung mit Agarosegelen ergeben. Die Bandenmuster in diesem Versuch stammen von einer Probe, der sogenannten Tatort DNA und von 5 Proben, die in diesem Fall von Verdächtigen stammen. Es ist wichtig, die Schüler darauf hinzuweisen, daß dieser Laborversuch eine Vereinfachung der wesentlich anspruchsvolleren Technik, die bei komplexen menschlichen DNA-Proben angewandt wird, darstellt.

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sitzen auf einem DNA-Molekül und gleiten entlang der Helix, bis sie spezifische Basenpaarsequenzen erkennen, die dem Enzym signalisieren, anzuhalten. An dieser Stelle, der sogenannten „Restriktionsschnittstelle“, verdauen die Enzyme dann das DNA-Molekül (spalten es chemisch) - sie haben also gewissermaßen die Funktion von molekularen Scheren, die die DNA an bestimmten Basenpaarsequenzen schneiden.

Tritt eine spezifische Restriktionsschnittstelle mehr als einmal in einem DNA-Molekül auf, so wird das entsprechende Restriktionsenzym an allen diesen Stellen schneiden und es entstehen mehrere Fragmente. Wenn also z.B. ein lineares Stück DNA-Molekül mit einem Restriktionsenzym verdaut wird, dessen spezifischer Erkennungscode an zwei verschiedenen Stellen auf dem DNA-Molekül vorkommt, entstehen drei Fragmente unterschiedlicher Länge. Ist die DNA ringförmig und wird sie mit einem Restriktionsenzym geschnitten, dessen spezifische Erkennungsstelle an zwei verschiedenen Stellen des DNA-Moleküls auftritt, so entstehen zwei Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Länge der einzelnen Fragmente hängt davon ab, wo sich die Restriktionsschnittstellen auf dem DNA-Molekül befinden.

Werden Restriktionsenzyme dazu benutzt, Einzelstränge ringförmiger DNA zu schneiden, (wie in diesem Kit vorgesehen) so entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe. Durch Restriktionsenzyme geschnittene DNA kann durch **Agarose-Gel-Elektrophorese** aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Der Begriff Elektrophorese steht für: *Wanderung unter dem Einfluß elektrischer Spannung.*

Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der Elektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Die DNA-Fragmente werden auf ein Agarose Trenngel geladen, das in eine Kammer gestellt wird, die mit einer elektrisch leitenden Pufferlösung gefüllt ist. Zwischen zwei Drahtelektroden an den beiden Enden der Kammer fließt Gleichstrom. DNA-Fragmente sind negativ geladen und werden daher in einem elektrischen Feld vom positiven Pol angezogen. Die Matrix des Agarosegels dient dabei als molekulares Sieb, durch das kürzere DNA-Fragmente leichter hindurchwandern können als größere. In einem bestimmten Zeitabschnitt wandern kleinere Fragmente weiter als größere. Fragmente von der gleichen Größe bleiben zusammen und wandern in separaten DNA-„Banden“. Diese Banden kann man im Gel sehen, nachdem die DNA angefärbt wurde.

Diese Situation kann verglichen werden mit einer Situation im Klassenzimmer, bei der alle Tische willkürlich zusammengeschoben sind. Ein einzelner Schüler kann sich durch das Stühlelabyrinth relativ schnell und ohne große Schwierigkeiten hindurchwinden, während eine Kette von vier Schülern länger braucht und größere Schwierigkeiten hat, sich den Weg durch den Stuhlirrgarten zu bahnen.

DNA-Fingerprinting

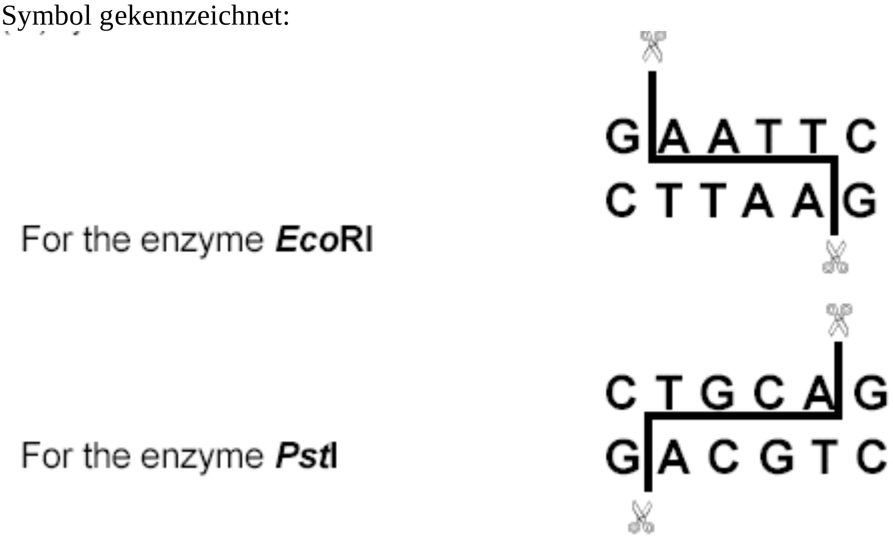
Zwischen den DNA-Sequenzen einzelner Personen gibt es Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Zum Nachweis, daß ein bestimmter Abschnitt der DNA eine spezifische Nukleotidsequenz enthält, kann eine radioaktive DNA-Sonde hergestellt werden, die diese Sequenz erkennt und an sie bindet. Mit Hilfe von radioaktiven Sonden können Molekularbiologen die DNA verschiedener Individuen sichtbar machen, identifizieren und vergleichen. Diese Sonde kann als ein radioaktives „Etikett" beschrieben werden, das sich an ein einzelsträngiges DNA-Fragment anlagert und in einem Gel oder auf einem Stück Nylonpapier, das das Gel abbildet (auch als Southern-Blot bekannt) als Bande zu erkennen ist. Aufgrund ihrer Spezifität kann eine radioaktive Sonde dazu dienen, genotypische Gemeinsamkeiten zwischen Individuen aufzuzeigen. Beim DNA-Fingerprinting ist die relative Lage der radioaktiv markierten Banden in einem Gel durch die Größe der DNA-Fragmente in den einzelnen Banden festgelegt. Die Größe der Fragmente wiederum hängt von den Variationen in der DNA einzelner Individuen ab.

Wir verschaffen einen schnellen Überblick über den Rahmen und die Intention dieses Handbuches. Detailliertere Information bietet ein Blick auf die Referenzliste auf Seite 7.

Das für das DNA-Fingerprinting benötigte Beweismaterial kann aus jedem biologischen Material gewonnen werden, das DNA enthält: Körpergewebe, Körperflüssigkeit (Blut und Samenflüssigkeit), Haarbalg, usw.. Die DNA-Analyse kann sogar mit getrocknetem Material wie z.B. Blutflecken oder mumifiziertem Gewebe durchgeführt werden. Falls nicht genügend DNA-Material vorhanden ist, kann es mit Hilfe von PCR-Methoden amplifiziert werden. Anschließend wird die DNA mit Restriktionsenzymen behandelt, die diese in verschieden lange Fragmente schneiden[4].

Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme sind die „chemischen Scheren" des Molekularbiologen, da sie die DNA schneiden. Wenn ein *bestimmtes* Restriktionsenzym eine *bestimmte* **Erkennungssequenz** aus vier bis sechs Basenpaaren (Bp) auf einem DNA-Abschnitt erkennt, wird das DNA-Molekül an dieser Stelle geschnitten. Die Erkennungssequenzen für zwei häufig verwendete Enzyme ***Eco*RI** und ***Pst*I** sind unten abgebildet. Die Stellen, an denen das DNA-Rückgrat tatsächlich geschnitten wird, sind mit dem (✂) Symbol gekennzeichnet:



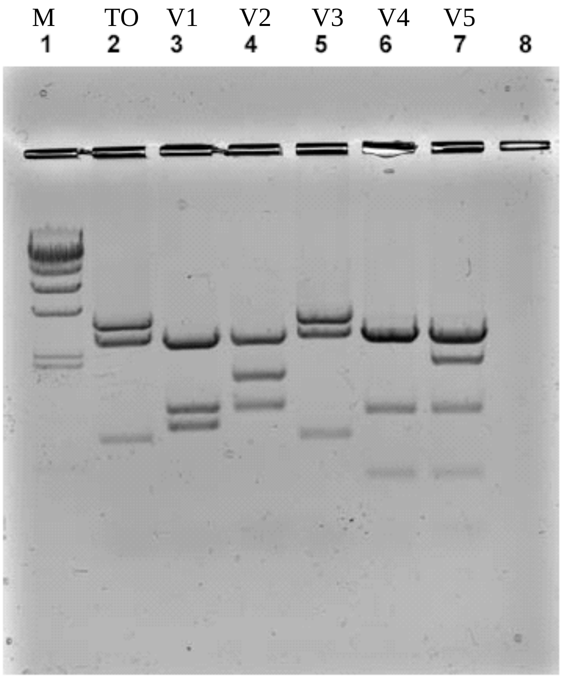
Wie alle Enzyme funktionieren Restriktionsenzyme am besten mit spezifischen Puffern und bei bestimmten Temperaturen. Der für das Restriktionsenzym geeignete Puffer ist bereits in der DNA-Probe enthalten, so daß beim Mischen der rehydrierten DNA mit den Enzymen die idealen Bedingungen für die Enzyme geschaffen werden, die ein optimales Funktionieren ermöglichen. Der endgültige Reaktionspuffer besteht aus 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DDT, pH 8,0, was die ideale Bedingung für die Funktion von *Eco*RI und *Pst*I darstellt.

Sichtbarmachen der DNA-Restriktionsfragmente

Die DNA ist farblos und daher sind die DNA-Fragmente im Gel nicht zu erkennen. Der DNA wird zum Auftragen ein blauer Puffer zugefügt, der zwei blaue Farbstoffe enthält. Die Farbstoffe färben nicht die DNA an, aber sie machen das Beladen des Gels einfacher und lassen das Fortschreiten der Elektrophorese besser überwachen. Die gefärbte Front läuft wie auch die DNA-Fragmente zum positiv geladenen Ende des Gels. Der „schnellere“ Farbstoff läuft wie DNA-Fragmente mit ca 500 Bp, während der „langsamere“ Farbstoff mit DNA-Fragmenten von ca. 5 kb Größe mitwandert.

Die genaue Position der DNA im Gel wird durch Anfärben sichtbar gemacht. Wenn das Gel in eine verdünnte Lösung des Fast Blast-DNA Anfärbemittels getaucht wird, lagern sich die Farbmoleküle an die im Agarosegel eingeschlossenen DNA-Moleküle an. Zum Verbessern des Kontrasts und zum leichteren Erkennen der DNA-Banden kann überschüssige Hintergrundfärbung durch Entfärben des Gels in Wasser entfernt werden. Nachdem die Banden sichtbar gemacht worden sind, können die Schüler die DNA-Restriktionsmuster der verschiedenen DNA-Proben miteinander vergleichen.

Das unten abgebildete Gel zeigt die Bandenmuster, die die Schüler nach der Elektrophorese erhalten. Die DNA vom Tatort ist mit TO gekennzeichnet, die vom Tatverdächtigen Nr. 1 mit V1, usw.. Die DNA vom Tatort ist in Bahn 2 aufgetragen, die DNA der Tatverdächtigen in Bahn 3, 4, 5, 6 und 7. In Bahn 1 ist der *HindIII*-Lambda Verdau (DNA-Größenmarker) mit aufgetragen. Es ist üblich, mit der Numerierung der Bahnen oben links anzufangen. Die Aufgabe der Schüler ist es, die DNA-Bandenmuster anzuschauen und festzustellen, ob die Banden eines Verdächtigen mit dem DNA-Bandenmuster der am Tatort gefundenen Probe übereinstimmen.



Es ist unschwer festzustellen, daß die DNA vom Tatort und vom Tatverdächtigen Nr. 3 identisch ist. Sie können an dieser Stelle darauf eingehen, wie „stark“ bzw. „schwach“ dieser Beweis für die Verurteilung eines Tatverdächtigen ist. Die Beweiskraft des DNA-Nachweises kann u.U. dazu ausreichen, den Tatverdächtigen mit dem Tatort in Verbindung zu bringen, aber um ihn bzw. sie schuldig zu sprechen, wird möglicherweise noch zusätzliches Beweismaterial benötigt.[5.6]

Sie sollten ihre Schüler darauf aufmerksam machen, daß es sich hierbei nur um eine Simulation handelt. Bei einem tatsächlichen DNA-Fingerprinting werden im Labor sehr viel größere DNA-Abschnitte eingesetzt und es werden viel mehr Bahnen und Banden produziert. Es wird dann nach einem spezifischen DNA-Abschnitt gesucht, der bei einer gegebenen Population immer vorhanden ist, aber für jedes Individuum ein spezifisches Bandenmuster ergibt.

Zuverlässigkeit der DNA Beweisführung

Bei der Einschätzung der Zuverlässigkeit der DNA-Fingerprinting Methode im Rahmen der Gerichtsmedizin spielen Populationsgenetik und genetische Statistik eine wichtige Rolle. Beim Menschen gibt es Tausende von RFLP-Loci oder von DNA-Abschnitten, die für die Fingerprint Analyse ausgewählt und verwendet werden können. Abhängig von demographischen Faktoren, wie die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Kulturgemeinschaft und geographischer Isolation werden einige Abschnitte mehr Variationen aufweisen als andere.

Einige Populationen zeigen viel weniger Variabilität bei bestimmten DNA-Abschnitten als andere. Der Grad der Variabilität bestimmt die statistische Wahrscheinlichkeit, daß mehr als ein Individuum dieselbe DNA-Sequenz aufweist. Weisen 90% der Individuen einer gegebenen Population bei einem bestimmten DNA-Abschnitt dasselbe Muster des DNA-Fingerprintings auf, so kann nur wenig an Informationen gewonnen werden. Ist aber die Wahrscheinlichkeit, daß in einer gegebenen Population für einen gegebenen DNA-Abschnitt ein bestimmtes DNA-Bandenmuster auftritt äußerst gering, so kann dieser Abschnitt als sehr aussagekräftiges Hilfsmittel dazu dienen, die Individuen dieser Population zu unterscheiden. Unterschiedliche Populationen weisen unterschiedliche Muster in ihren Genotypen auf, die auf die im Laufe der Zeit erfolgten Einflüsse auf den Genpool zurückzuführen sind.

Bei der Analyse, wie schwer die Beweislast eines bestimmten DNA-Bandenmusters wiegt, muß daher folgende Frage gestellt werden:

„Wie viele Individuen einer Population könnten statistisch gesehen dasselbe DNA-Bandenmuster wie das der am Tatort gefundenen Probe aufweisen: 1 von 1.000.000, 1 von 10.000 oder 1 von 10.

Literaturhinweise

1. DNA Profiling Fast Becoming Acceptied Tool For Identification, Pamela Zurer, *Chemical and Engineering News*, 10. Okt., 1994.
2. PCR steht für Polymerase Chain Reaction; dies ist eine Methode, mit der kleine Mengen DNA amplifiziert (vermehrt) werden können (in diesem Fall, um weitere Analysen an der DNA durchführen zu können).
3. RFLP steht für Restriktion Fragment Length Polymorphism..“riff-lips“ im Biotech Jargon. DNA-Abschnitte werden mit Restriktionsenzymen in unterschiedlich lange Fragmente gespalten. Verschiedene Individuen besitzen unterschiedliche Erkennungsstellen, so daß zwei DNA-Abschnitte aus unterschiedlichen Quellen unterschiedlich lange Fragmente ergeben können, wenn ihre DNA von demselben Enzym geschnitten wird.
4. Eine ausgezeichnete Quelle für die Lehrkraft ist: Genetic Fingerprinting, Pauline Lowrie and Susan Wells, *New Scientist*, 16 Nov. 1991.
5. Is DNA-Fingerprinting ready for use in courts?, William C. Thompson and Simon Ford, *New Scientist*, 31. März, 1990.
6. When Science Takes the Witness Stand, Peter Neufeld and Nevelle Coleman, *Scientific American*, Vol. 262: 5, Mai 1990.

Zeitplan für die Durchführung

Zu diesem Fingerprinting Lehrplan gehören vier Unterrichtsstunden. Alle Unterrichtspläne sind so angelegt, daß sie innerhalb von je 50 Minuten durchgeführt werden können. Alle Unterrichtspläne beinhalten:

- Eine Reihe von Überlegungen, die die Schüler vor der Durchführung des eigentlichen Experiments anstellen sollten.
- Eine von den Schülern aktiv durchzuführende Untersuchung.
- Fragen zur Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.

Unterrichtsplan für die Schüler

1. Stunde:	**Einführung zum DNA-Fingerprinting**
Aktivität	Vortrag und Diskussion Vorüberlegung zu Experiment 1 und 2
2. Stunde	**Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen**
Aktivität	Gießen von Gelen, Durchführung der enzymatischen Spaltung Abschluß der vorläufigen Analyse und Beantwortung von Fragen
3. Stunde	**Elektrophorese der DNA-Proben**
Aktivität	Beladen und Laufenlassen der Gele; Anfärben der Gele über Nacht Durchführung der Analyse und Beantwortung von Fragen
4. Stunde	**Analyse und Interpretation der Ergebnisse**
Aktivität	Entfärben der Gele Fragen zur Durchführung der Analyse Anfertigen der Standardkurve Diskussion der Ergebnisse und Abwägen der Beweiskraft

Überblick über die Vorbereitungen der Lehrkraft

In diesem Abschnitt wird der empfohlene Zeitplan für die von der Lehrkraft durchzuführenden Vorbereitungen zusammengefaßt. Eine ausführliche Beschreibung der durchzuführenden Vorbereitungen finden Sie auf den Seiten 11 – 18.

Aktivität	Wann?	Benötigte Zeit
Lektüre der Fingerprinting Anleitung	sofort	1 Stunde
Vorbereiten des TAE Elektrophoresepuffers Gießen der Agarosegele	vor oder während der 2. Stunde	1 Stunde
Rehydrieren der lyophilisierten DNA/ Probenpuffer und Enzyme mischen und aliquotieren	vor der 2. Stunde	20 Minuten
Vorbereiten des Fast Blast DNA-Anfärbemittels	vor der 3. Stunde	10 Minuten
Vorbereiten der Arbeitsplätze	am Tag der Versuchsdurchführung	10 Minuten/Tag

Checkliste (✓) für den Arbeitsplatz

Arbeitsplätze der Schüler: Materialien und Zubehör, die zu Beginn jedes Versuchstages an jedem Schülerarbeitstag vorhanden sein sollten, sind unten aufgelistet. Die mit diesem Kit bereitgestellten Komponenten reichen für 8 Schülerarbeitsplätze (4 Schüler pro Arbeitsplatz).

Arbeitsplatz der Lehrkraft (von allen genutzte Materialien): Eine ebenfalls unten aufgeführte Liste von Materialien und Ausrüstungsgegenständen, die an einem Ort aufgestellt werden müssen, der allen Schülern zugänglich ist. Es bleibt der Lehrkraft überlassen, ob die Schüler Zugang zu den gemeinsam genutzten Pufferlösungen und Materialien haben oder ob die Lehrkraft die Lösungen aliquotiert und die Geräte selbst bedient.

2. Stunde: Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen

Schülerarbeitsplätze	Anzahl/Arbeitsplatz	(✓)
Agarosegel-Elektrophorese System (Elektrophorese-Kammer, Gelgießstand, 8-Well Kamm)	1	❑
*Eco*RI/*Pst*I Enzym-Mix	1 Reaktionsgefäß (80 µl)	❑
Pipettenspitzen, 2-200 µl	15 Spitzen	❑
Mikropipette, 2-20 µl	1	❑
Farbcodierte Reaktionsgefäße: grün, blau, orange, violett, rot, gelb	1	❑
Filzschreiber	1	❑
Abfallbehälter	1	❑
Reaktionsgefäßständer aus Styropor	1	❑
Kübel mit Eis	1	❑
Laborklebeband (nicht Marke Scotch 3M oder ein ähnliches Band)	1	❑

Arbeitsplatz der Lehrkraft		
DNA vom Tatort, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.1, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.2, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.3, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.4, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.5, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
Geschmolzene 1%ige Agarose in 1x TAE (siehe Unterrichtsvorbereitung)	40-50 ml/Gel	❑
Brutschrank oder Wasserbad (37°C) - optional	1 / Klasse	❑
Mikrozentrifuge oder	1 / Klasse	❑
Minizentrifuge	4 / Klasse	❑

Bitte tragen Sie im Labor immer eine Schutzbrille.

Bitte beachten Sie immer die angemessenen Sicherheitsvorschriften, wie z.B. Verbot von Essen und Trinken.

3. Unterrichtsstunde: Elektrophorese der DNA-Proben

Schülerarbeitsplätze	**Anzahl/Arbeitsplatz**	**(✓)**
Agarosegel-Elektrophorese System	1	❑
Agarose Gel	1	❑
Verdaute DNA-Proben	6	❑
HindIII/Lambda Verdau (DNA-Marker)	1	❑
DNA-Frontmarker	1	❑
Filzschreiber (Permanent Marker)	1	❑
Pipettenspitzen, 2-20 µl	13	❑
Mikropipette, 2-20 µl	1	❑
Abfallbehälter	1	❑
Gel Support Film (ggf.)*	1	❑
Fast Blast DNA-Anfärbelösung (1x)*	120 ml pro 2 Arbeitsplätze	❑
Große Behälter zum Entfärben (ggf.)*	1-3 pro 2 Arbeitsplätze	❑
Reaktionsgefäßständer aus Styropor	1	❑
Netzgerät	1	❑
Gelfärbeschale	1	❑
1x TAE Elektrophoresepuffer	275 ml Gel/Kammer	❑

Arbeitsplatz der Lehrkraft		
Mikrozentrifuge oder Minizentrifuge (optional)	1	❑
Schüttler	1	❑

4. Unterrichtsstunde: Analyse der Ergebnisse

Schülerarbeitsplätze	**Anzahl/Arbeitsplatz**	**(✓)**
Lineal mit Millimetereinteilung	1	❑
Halblogarithmisches Zeichenpapier	1	❑
Gel Support Film (ggf.)*	1	❑

Arbeitsplatz der Lehrkraft

Nicht erforderlich

* Je nachdem, ob die Schnellfärbung oder die Über-Nacht-Färbung verwendet wird.

Unterrichtsvorbereitung durch die Lehrkraft

In diesem Abschnitt wird beschrieben, welche Vorbereitungen die Lehrkraft vor jeder Unterrichtsstunde treffen muß. Für jeden Abschnitt wird die geschätzte Arbeitszeit angegeben.

2. Unterrichtsstunde (Labor): Verdau der DNA-Proben mit Restriktions-enzymen

Unterrichtsvorbereitung

Ziele: Rehydrieren der DNA/Puffer-Proben und der Restriktionsenzyme
Aliquotieren der Restriktionsenzyme
Gießen der Agarosegele. **Falls die Schüler ihre eigenen Gele während der Unterrichtsstunde gießen sollen, ist ein rechtzeitiges Vorbereiten der Agarose notwendig. Nachdem die Agarose vorbereitet ist, kann sie in einem Wasserbad von 50-55°C aufbewahrt werden, bis die Schüler sie benutzen**.
Stellen Sie die Temperatur des Wasserbades auf 37°C ein.
Vorbereiten der Schüler- und Lehrerarbeitsplätze

Zeitaufwand: Eine halbe bis eine Stunde (je nachdem, wie Sie die Agarosegele vorbereiten).

Erforderlich: Elektrophoresekammern, Gelträger und Gelkämme
Elektrophoresepuffer (50xTAE)
Agarosepulver
8 farblose Reaktionsgefäße
3 Liter Destilliertes Wasser

Vorgehensschritte

Beachten Sie: Alle Gefäße mit DNA und Enzymen sollten einen weißen Rückstand enthalten, der in den DNA-Gefäßen locker pulvrig erscheint. Die lyophilisierten DNA-Proben haben farbige Markierungen auf durchsichtigen Glasgefäßen. Die lyophilisierte Mischung der *Eco*RI/*Pst*I Enzyme befindet sich in einem bernsteinfarbenen Gefäß.

1. **Rehydrieren der Proben**
   Um die DNA/Puffer Proben zu rehydrieren, fügen Sie 200 µl **steriles** Wasser zu jedem Gefäß mit lyophilisierter DNA und mixen Sie sie, um sie in Lösung zu bringen. Lassen Sie die DNA/Puffer-Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen, oder solange, bis sie gelöst sind. Möglicherweise ist ein vorsichtiges Erhitzen auf 37°C für 10 Minuten erforderlich. Um den Schülern das Pipettieren zu erleichtern, können Sie die rehydrierten DNA/Puffer-Proben in farbige, beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführen.
   Die rehydrierten DNA-Proben haben nun eine Konzentration von 0,3 µg/µl in 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 20 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, pH 8,0. Wird die DNA-Pufferlösung zu den Enzymen gebracht, entsteht eine Endkonzentration von Puffern aus 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 8,0, was die optimale Reaktionsbedingung für die Enzyme *Eco*RI und *Pst*I darstellt.

2. **Rehydrieren des lyophilisierten EcoRI/PstI Enzym-Mixes**
   Um die *Eco*RI/*Pst*I Enzymmischung zu rehydrieren, fügen Sie 750 µl **steriles** Wasser hinzu und mixen, um die Enzyme zu resuspendieren. Lassen sie die Enzyme 5 Minuten lang auf Eis rehydrieren. Es ist entscheidend, daß die Enzyme, nachdem sie rehydriert wurden, auf Eis gehalten werden, aber nicht eingefroren werden. Die rehydrierten Enzyme sollten innerhalb von 12 Stunden verbraucht werden.

3. **Aliquotieren der Enzymmischung**
   Pipettieren Sie 80 µl der rehydrierten Enzymmischung in jedes der acht 1,5 ml Reaktionsgefäße, die mit **ENZ** markiert wurden.

4. **Vorbereiten von Agarosegelen**.* Die für diesen Versuch empfohlene Gelkonzentration beträgt 1 % Agarose. Mit dieser Agarosekonzentration wird für die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente eine ausgezeichnete Auflösung und eine minimale Laufzeit erreicht. Für ein leichtes Auftragen der Probe sowie eine leichte Handhabung des Gels wird eine Geldicke von 0,75-1,0 cm empfohlen. **Die Agarose muß mit Elektrophoresepuffer und darf nicht mit Wasser angesetzt werden.**

a. **Zubereitung des Elektrophoresepuffers**. Der Elektrophoresepuffer TAE (Tris-Acetat-EDTA) ist als 50x konzentrierte Lösung erhältlich. Außer dem 1x TAE Puffer zur Herstellung der Agarosegele, werden ca. 275 ml für jede Elektrophoresekammer benötigt. Drei Liter des 1x TAE Puffers reichen aus, um 8 Elektrophoresekammern zu füllen und 8 Agarosegele zu gießen. Zur Herstellung von 3 Litern 1x TAE aus einem 50x TAE Konzentrat, fügen Sie 60 ml des 50x Konzentrates zu 2,94 Litern destilliertem Wasser.

b. **Vorbereiten der Agarose**. Diese Arbeitsschritte können 1 bis 2 Tage vor dem Versuch von der Lehrkraft oder während des Unterrichts von einzelnen Schülerteams durchgeführt werden.

i. Zur Herstellung einer 1% Lösung, werden 1g Agarose in 100 ml 1x TAE Elektrophoresepuffer gelöst. Die Agarose muß mit Elektrophoresepuffer und darf nicht mit Wasser angesetzt werden.
Falls die Elektrophoresekammern nicht ausreichen, können Sie eine 7 x 10 cm Schale und zwei Kämme mit 8 Taschen benutzen, um ein Gel zu gießen, das für zwei Ansätze des von den Studenten durchgeführten Verdaus ausreicht.
Nehmen Sie die folgende Tabelle als Anhaltspunkt für die **Volumina**, die zum Gießen von einem oder mehreren 1%igen Agarose-Gelen, benötigt werden:

Anzahl der Gele	7 x 7 cm Gelträger	7 x 10 cm Gelträger
1	40 ml	50 ml
2	80 ml	100 ml
4	160 ml	200 ml
8	320 ml	400 ml

ii. Geben Sie das Agarosepulver in einen geeigneten Behälter (z.B. einen 500 ml Erlenmeyerkolben für 200 ml oder weniger). Geben Sie die richtige Menge an 1x TAE Elektrophoresepuffer hinzu und schwenken Sie den Kolben, um das Agarosepulver im Puffer aufzulösen. Falls Sie einen Erlenmeyerkolben verwenden, stülpen Sie ein 25 ml Erlenmeyerkölbchen kopfüber über den Hals des die Agarose enthaltenden Kolbens. Das Kölbchen wirkt als Rückflußkammer und erlaubt so ein langes bzw. heftiges Kochen ohne allzu große Verluste durch Verdunsten. Die Agarose kann zum Gießen der Gele durch Kochen auf einer Magnetrührerheizplatte, in einem heißen Wasserbad oder in einem Mikrowellenherd geschmolzen werden.

Vorsicht: Tragen Sie beim Zubereiten und Gießen der Agarosegele immer Schutzhandschuhe, Schutzbrille und einen Laborkittel. Kochend heiße geschmolzene Agarose oder Behälter, die heiße Agarose enthalten, können bei Kontakt mit der Haut zu schweren Verbrennungen führen.

Methode mit dem Mikrowellenherd. Diese Technik ist die schnellste und sicherste, um die Agarose zum Schmelzen zu bringen. Stellen Sie die Gellösung in einer geeigneten Flasche oder in einem Kolben in die Mikrowelle. LOCKERN SIE DEN DECKEL, FALLS SIE EINE FLASCHE BENUTZEN. Wählen Sie eine mittlere Einstellung und stellen sie auf 3 Minuten. Stoppen Sie den Mikrowellenherd alle 30 Sekunden und schwenken Sie die Flasche, um noch nicht gelöste Agarose zu suspendieren. Kochen und schwenken Sie die Agarose solange, bis **alle** kleinen, durchsichtigen Agaroseteilchen gelöst sind. Stellen Sie die Lösung zur Seite und lassen Sie sie auf 55-60 °C abkühlen, ehe Sie sie verwenden.

*Geeignete vorgegossene Agarosegele (# 166-3057EDU) sind bei Bio-Rad erhältlich. Dies sind 1x TAE Gele mit 8 Taschen (2 Stück) und passen in die Bio-Rad Mini Sub Cell GT Kammer oder in jede andere horizontale Gel-Elektrophorese-Kammer für 7x10 cm große Gele.

Methode mit der Magnetrührerheizplatte. Geben Sie einen Rührfisch zur noch nicht gelösten Agarosemischung. Heizen Sie die Mischung unter Rühren des Magnetrührers bis zum Sieden auf. Blasen und Schaum sollten platzen, bevor sie bis zum Kolbenhals aufsteigen.

Kochen Sie die Mischung, bis alle kleinen, durchsichtigen Agarosepartikel sich gelöst haben. Stellen Sie die Lösung zur Seite und lassen Sie sie auf 55-60°C abkühlen, ehe Sie sie verwenden.

Sie können die Agarose auch einige Stunden im voraus schmelzen und dann in einem Wasserbad bei 55-60°C halten, ehe Sie oder die Schüler die Gele gießen.

c. Anleitung zum Gießen der Agarosegele

Für diesen Versuch muß jedes Gel mindestens 7 Geltaschen besitzen. Folgen Sie den obigen Anweisungen zur Zubereitung der Agarose und entscheiden Sie, welches Volumen an 1%iger Agarose Sie für Ihre Klasse(n) benötigen. Füllen Sie soviel Agarose ein, daß die Zähne des Gelkamms vollständig bzw. bis zu einer Tiefe von 0,5 – 0,75 cm bedeckt sind. Solange das Gel noch nicht fest geworden ist, dürfen Sie den Gelträger nicht berühren oder bewegen. Nachdem die Gele fest geworden sind, können Sie sie in verschließbaren Plastikbeuteln einen Tag bei Raumtemperatur oder bis zu einer Woche im Kühlschrank bis zum Gebrauch aufbewahren. Lassen Sie die Schüler ihre Plastikbeutel beschriften. Für das Gießen, der für die ganze Klasse benötigten Gele, sollten Sie ca. 30 Minuten einplanen. Gießen Sie nach Möglichkeit ein oder zwei Gele als Ersatz. Dieser Abschnitt stellt kurz die konventionelle Gel-Träger-Abklebemethode zum Gießen von Gelen dar. Verwenden Sie das Bio-Rad Mini Sub-Cell GT System, so können die Gele direkt in der Elektrophoresekammer gegossen werden, indem sie die für den Gelträger vorgesehenen Seitenträger verwenden. Andere Methoden werden ausführlich in der Bedienungsanleitung zur Sub-Cell® GT Cell (Elektrophoresekammer) beschrieben.

Schritt 1. Verschließen Sie die Seiten des Gelträgers mit normalem Laborklebeband (kein Scotch oder ein ähnliches Band). Drücken Sie das Band fest auf die Ecken des Gelträgers, so daß keine Flüssigkeit austreten kann.

Schritt 2. Richten Sie den Gelträger auf einem Nivelliertisch oder mit der mitgelieferten Wasserwaage auf einer normalen Arbeitsbank aus.

Schritt 3. Lösen Sie die Agarose in der gewünschten Konzentration und Menge in 1x TAE Elektrophoresepuffer auf.

Schritt 4. Lassen Sie die Agarose auf wenigstens 60°C abkühlen, ehe Sie mit dem Gießen beginnen.

Schritt 5. Während die Agarose auf 60°C abkühlt, setzen Sie, den Gelkamm in den entsprechenden Schlitz des Gelträgers. Gelkämme sollten nicht weiter als 2 cm vom Ende des Gelträgers positioniert werden, wenn ein Gel mit nur einem Kamm gegossen wird (7x7cm Gelträger). Wenn ein Gel mit zwei 8-Well-Kämmen gegossen wird (7x10 cm Gelträger), plazieren Sie einen Kamm an das eine Ende und den anderen Kamm in die Mitte des Gelträgers. Die Kämme formen die Taschen, in die die Proben geladen werden.

Schritt 6. Geben Sie dem Gel 10 bis 20 Minuten Zeit, sich zu verfestigen – es erscheint trüb bzw. opak, wenn es gebrauchsfertig ist.

Schritt 7. Ziehen Sie den Gelkamm vorsichtig aus dem fest gewordenen Gel.

Schritt 8. Ziehen Sie das Klebeband von den offenen Seiten des Gelträgers ab.

Schritt 9. Sie haben zwei Auswahlmöglichkeiten:

Option 1: Wenn Sie nicht genug Zeit haben, mit der 2. Unterrichtsstunde fortzufahren, lagern Sie die Gele in einer verschließbaren Plastiktüte 1 Tag bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank bis zu einer Woche lang bis zum weiteren Gebrauch. Die Schüler sollen ihre Plastiktüten beschriften.

Option 2: Haben Sie genug Zeit, mit der 2. Unterrichtsstunde fortzufahren, setzen Sie den Gelträger so auf die nivellierte DNA-Elektrophoresezelle, daß die Probentaschen sich am Kathodenende des Sockels (schwarz) befinden. Die DNA-Proben wandern während der Elektrophorese zum Anodenende des Sockels (rot).

Verdau mit dem Restriktionsenzymgemisch. Optimale Bedingungen für den Verdau sind 45 Minuten Inkubation bei 37°C. Steht kein 37°C Heizblock, Wasserbad oder Inkubator zur Verfügung, stellen Sie die Proben zum Verdau in Styroporständer, die von einem großen Volumen (1 Liter oder mehr) 37°C warmen Wassers umspült werden. Lassen Sie die Proben über Nacht inkubieren, wobei das Wasser auf Raumtemperatur abkühlt.

Verwendung von Mikropipetten (optional)

Wir empfehlen, dass Sie Ihre Schüler vor der 1. Unterrichtsstunde mit korrekten Pipettierungstechniken vertraut machen. Ihre Schüler sollen lernen, wie sie verschiedene Volumina einer Lösung von einem in ein anderes Röhrchen mit einer Mikropipette überführen. Die Schüler können dies üben, in dem sie entweder die Farbstofflösung zum Auftragen der Probe verwenden oder stark gesättigte Zucker- oder Glycerinlösung, die mit Lebensmittelfarbe angefärbt wurde. Im Folgenden finden Sie eine Zusammenfassung, wie man Mikropipetten verwendet:

1. Schauen Sie auf die Mikropipette, um den Volumenbereich festzulegen.

2. Drehen Sie die Scala auf der Mikropipette, um Ihr gewünschtes Volumen einzustellen.

3. Stecken Sie eine saubere Pipettenspitze auf die Mikropipette.

4. Drücken Sie den Mikropipettenkolben bis zum **ersten** (weichen) Widerstand.

5. Führen Sie die Pipettenspitze in die zu überführende Lösung ein.

6. Lassen Sie den Kolben langsam in die Ausgangsposition zurückkehren, um die Flüssigkeit hinaufzuziehen.

7. Führen Sie die Pipettenspitze in das gewünschte Röhrchen.

8. Drücken Sie den Kolben nach dem ersten Widerstand weiter zum **zweiten** Widerstand, um die Flüssigkeit in das Röhrchen zu überführen. Stellen Sie sicher, daß der Kolben gedrückt bleibt, wenn Sie die Pipettenspitze aus dem Röhrchen ziehen.

9. Drücken Sie die Pipettenspitze von der Mikropipette.

3. Unterrichtsstunde (Labor): Elektrophorese und Anfärben der DNA-Proben.

Unterrichtsvorbereitung

Ziel:	Vorbereiten des Lambda/*Hind*III-Verdaus (DNA-Größenmarker) und Aliquotieren (optional) Aliquotieren des DNA-Frontmarkers („sample loading dye“) c Verdünnung der 1x Fast Blast DNA-Färbelösung (Färbung über Nacht) oder 100x (für schnelles Färben) Vorbereiten der Schüler und Lehrerarbeitsplätze
Zeitaufwand:	45 Minuten
Erforderlich:	Stammlösung: DNA-Größenmarker (Lambda/*Hind*III-Verdau) Stammlösung: DNA-Frontmarker Elektrophoresekammer, Geißstände und Kämme Elektrophoresepuffer (1x TAE) Stammlösung: Fast Blast DNA-Färbelösung (500x)

Abläufe

1. Vorbereiten des Lambda/*Hind*III-Verdaus (DNA-Größenmarker) und Aliquotieren (optional)
Geben Sie 20 µl Frontmarker zum Röhrchen mit der Stammlösung der *Hind*III-DNA-Größenmarker. Wenn möglich, erhitzen Sie den Marker 5 Minuten bei 65°C und kühlen ihn dann auf Eis – dies bewirkt eine bessere Trennung der Markerbanden. Beschriften Sie 8 farblose Reaktionsgefäße mit „M“. Aliquotieren Sie in diese mit „M“ beschrifteten Reaktionsgefäße je 15 µl der DNA-Größenmarker/Frontmarker Lösung.

2. Aliquotieren des Frontmarkers
Beschriften Sie 8 farblose Reaktionsgefäße mit „**FM**“. Aliquotieren Sie je 50 µl Frontmarker in diese 8 markierten Reaktionsgefäße. Verteilen Sie sie auf die Arbeitsplätze der Schüler.

3. Vorbereitung der Elektrophoresekammer

Wenn das Agarosegel fest geworden ist, kann man mit dem Auftragen der Probe und der Elektrophorese beginnen.

a. Wenn Sie den Gelträger in die Elektrophoresekammer setzen, stellen Sie sicher, dass sich die Probentaschen am schwarzen Kathodenende befinden. Die DNA-Proben wandern während der Elektrophorese zum roten Anodenende.

b. Bereiten Sie das erforderliche Volumen von 1x TAE-Puffer vor, wenn Sie es nicht schon vorbereitet haben.

c. Tauchen Sie das Gel etwas 2mm unter den 1x TAE-Puffer.

d. Bereiten Sie die Proben zum Auftragen auf das Gel vor. Siehe Laborprotokoll im Schülerhandbuch.

Achtung: Der Energiebedarf kann je nach Geldicke, Laufzeit, Konzentration und Art des Elektrophoresepuffers variieren. Für diesen Versuch beträgt die empfohlene Laufzeit 30 Minuten bei einer Spannung von 100 V (konstant).

4. Vorbereiten der Fast Blast DNA-Färbelösung

A. Zur Herstellung der 100x Färbelösung (zum schnellen Färben): Verdünnen Sie in einem Kolben von geeigneter Größe 100 ml der 500x DNA-Färbelösung mit 400 ml destilliertem Wasser. Verschließen Sie den Kolben und halten Sie ihn bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur.

B. Zur Herstellung der 1x Färbelösung (Färbung über Nacht):Verdünnen Sie in einem Kolben von geeigneter Größe 1 ml der 500x DNA-Färbelösung mit 499 ml destilliertem Wasser. Verschließen Sie den Kolben und halten Sie ihn bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur.

DNA-Färbeverfahren – Fast Blast DNA-Färbung

Die Fast Blast DNA-Färbung ist eine praktische, sichere und ungiftige Alternative zur Färbung mit Ethidiumbromid. Die Färbelösung besteht aus einem kationischen Farbstoff aus der Familie der Thiazine. Die positiv geladenen Farbstoffmoleküle haben eine sehr hohe Affinität zu den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA Moleküle. So entsteht eine feste Bindung, bei der die DNA durch eine tiefe Blaufärbung sichtbar wird.

Die Fast Blast DNA-Färbelösung wird als 500x Konzentrat geliefert und muß vor der Verwendung verdünnt werden. Verdünnen Sie den Farbstoff auf 100x, um DNA innerhalb von 12-15 Minuten anzufärben oder auf 1x, wenn Sie über Nacht färben möchten. Wenn das Agarosegel in den Fast Blast Farbstoff eingetaucht wird, lagern sich die die Farbstoffmoleküle an die DNA-Moleküle im Agarosegel. Wenn die DNA-Banden sichtbar sind, können Ihre Schüler die DNA-Restriktionsmuster von den verschiedenen DNA-Proben vergleichen.

Detaillierte Anweisungen zur Fast Blast Färbung finden Sie im Schülerhandbuch.

ACHTUNG:

Die Fast Blast DNA-Färbelösung ist ungiftig und nicht krebserregend. Trotzdem sollten Laborhandschuhe aus Latex oder Vinyl getragen werden, wenn mit der Färbelösung oder gefärbten Gelen hantiert wird, um eine Anfärbung der Hände zu vermeiden. Schutzkleidung, wie Laborkittel, sollten getragen werden, um eine Färbung der Kleidung zu vermeiden. Entsorgen Sie die Färbelösung entsprechend den Vorschriften Ihrer Einrichtung. Verwenden Sie eine 10% Bleichlösung oder 70% Alkohol, um Färbelösung von den meisten Oberflächen zu entfernen. Überprüfen Sie bitte vorher, dass diese Stoffe die Oberfläche nicht beschädigen.

Bemerkungen

∞ Wir empfehlen 120 ml verdünnte Fast Blast-Lösung, um zwei Gele von 7x7 cm oder 7x10 cm in den einzelnen Färbeschalen anzufärben, die mit diesem Kit geliefert werden. Bitte markieren Sie die Gele zur besseren Unterscheidung, in dem Sie eine Ecke abschneiden. Wenn Sie andere Färbeschalen verwenden, nehmen Sie bitte eine ausreichende Menge Färbelösung, so dass das Gel vollständig bedeckt ist.

∞ Nach der Elektrophorese müssen die Agarosegele aus dem Gelträger genommen werden, bevor sie in die Färbelösung gelegt werden. Dies geht leicht, wenn Sie mit einer Hand den Boden des Gelträgers halten und das Gel vorsichtig mit dem Daumen der anderen Hand herausdrücken.

∞ Weil das Gel leicht reißen kann, muß man sehr vorsichtig damit umgehen. Wir empfehlen, einen Spatel oder eine andere Auflagefläche zu verwenden, wenn das Gel während der Entfärbungsschritte (bei der Schnellfärbung) von einem Behälter in einen anderen überführt wird.

- Zum Entfärben (bei der Schnellfärbung) benötigen Sie für jeden Schülerarbeitsplatz einen großen Behälter, der mindestens 500 ml faßt. Jedes Schülerteam kann entweder unterschiedliche Behälter für jeden Waschschritt nehmen oder einen Behälter nehmen, der nach jeder Wäsche geleert wird.

- Die 100x Fast Blast Färbelösung kann mindestens 7x verwendet werden.

- Für die Färbung über Nacht sind keine Wasch- und Entfärbungsschritte notwendig. Am besten ist es, die Gele zu schütteln, während sie über Nacht färben. Steht ein Schüttler zur Verfügung, können mehrere Gele in einem großen Behälter gefärbt werden, falls sie so (z.B. durch Abschneiden verschiedener Ecken) markiert sind, dass sich die Gele der verschiedenen Schülergruppen unterscheiden lassen.

4. Unterrichtsstunde Trocknen der Gele und Analyse der DNA-Muster

Unterrichtsvorbereitung

Ziel:	Vorbereitung der Arbeitsplätze
Benötigte Zeit:	10 Minuten
Verfahren:	Für diese Laborstunde müssen keine Reagenzien hergestellt oder aliquotiert werden.

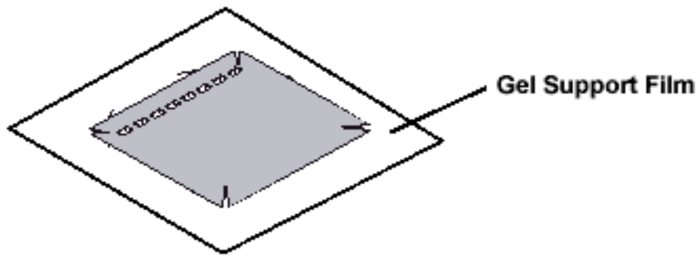
Um einen permanenten Beleg des Gels vor dem Trocknen zu erhalten, fertigen Sie entweder eine Skizze des Gels einschließlich der Probentaschen und DNA-Banden an, fotografieren Sie das Gel, wobei Sie Standardkameras und Filme benutzen (Bio-Rads Standard Polaroid Gel Dokumentationssystem) oder fotokopieren Sie das gefärbte Gel.

Trocknen des Agarosegels als permanenten Beleg des Experiments

Hinweis: Das Trocknen der Agarosegele setzt voraus, daß für die Elektrophorese die spezielle **High Strength Analytical Grade Agarose von Bio-Rad** verwendet wurde. Andere Gelmedien eignen sich u. U. nicht für diesen Zweck. Zum Trocknen von Agarosegelen gibt es zwei Methoden:

Methode 1

Methode 1 wird bevorzugt und erfordert den **Gel Support Film** (Katalog Nummer 170-2984-EDU), der nur von Bio-Rad erhältlich ist. Nehmen Sie einfach das entfärbte Gel aus der Färbeschale und schneiden Sie nicht benutzte Bahnen mit einem Messer oder einer Rasierklinge ab. Legen Sie das Gel direkt auf die hydrophile Seite eines Gel Support Films. Das Wasser bildet Tropfen auf der hydrophoben Seite, aber auf der hydrophilen Seite des Films wird es sich flach ausbreiten. Zentrieren Sie das Gel auf dem Film. Legen Sie den Film auf ein Stück Papiertuch und lassen Sie ihn trocknen, wobei Sie direktes Sonnenlicht vermeiden. Während das Gel trocknet, verbindet es sich mit dem Film und schrumpft daher nicht. Läßt man das Gel ruhig auf dem Trägerfilm liegen, trocknet es bei Raumtemperatur innerhalb von 2-3 Tagen aus. Sie erhalten so einen flachen, transparenten und haltbaren Nachweis des Experiments.



Methode 2

Nachdem Sie das Gel gefärbt und entfärbt haben, lassen Sie es einfach in der Plastikfärbeschale liegen. Lassen Sie es an der Luft 2-3 Tage lang trocknen. Beim Trocknen schrumpft das Gel beträchtlich aber proportional. Sofern das Gel in der Schale nicht bewegt wird, sollte es relativ flach bleiben, jedoch werden sich Falten bilden.

Hinweis: Vermeiden Sie es, das Gel längere Zeit direktem Licht auszusetzen, da sonst die Banden verblassen.

Graphische Darstellung der Daten

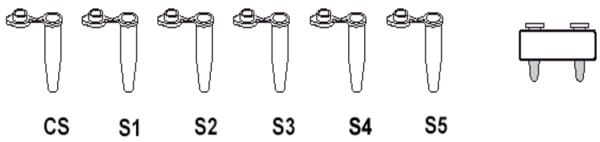
Viele Ihrer Schüler sind wahrscheinlich nicht mit Logarithmen und halblogarithmischem Zeichenpapier vertraut. Wir schlagen deshalb einen kurzen Vortrag mit Hilfe eines Overhead Projektors oder eines Computers vor, um Ihren Schülern zu zeigen, wie die Achsen beschriftet und die Datenpunkte eingetragen werden. Sie können an dieser Stelle auch auf die unterschiedliche Anwendung von halblogarithmischem und Standardmillimeterpapier eingehen. Weiterhin könnten Sie diese Gelegenheit nutzen, einen mathematischen Exkurs über lineare und exponentielle (arithmetische und geometrische) Zahlenreihen anzufügen. Wir haben in diesem Handbuch sowohl halb-logarithmisches Zeichenpapier als auch Standardmillimeterpapier abgebildet (siehe Seite 46 u. 47).

Kurzanleitung für den DNA Fingerprinting Kit

2. Stunde Restriktionsverdau



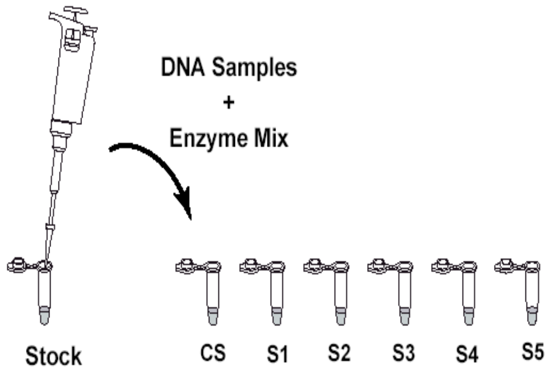
1. Die Reaktionsgefäße, die den Enzym-Mix (= ENZ) und den Restriktions-Puffer (RB) enthalten, werden auf Eis gestellt.



2. Die bunten Reaktionsgefäße werden wie folgt beschriftet:

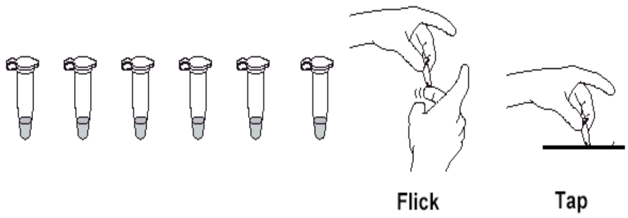
grün	CS = Tatort (crime scene)
blau	S1 = Verdächtiger #1
orange	S2= Verdächtiger #2
violet	S3= Verdächtiger #3
rot	S4= Verdächtiger #4
gelb	S5= Verdächtiger #5

Zusätzlich sollte Name, Datum u. ggf. Kursnummer vermerkt werden



3. Je 10 µl von jeder DNA Probe werden von dem Vorratsgefäß in das entsprechende bunte Reaktionsgefäß pipettiert. Für jede Probe ist eine neue Pipettenspitze zu verwenden! Es sollte überprüft werden, dass die Probe auf den Boden des Reaktionsgefäßes gelangt ist.

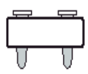
4. Je 10 µl Restriktionsenzym-Mix (ENZ) wird in jedes Reaktionsgefäß zu den DNA-Proben pipettiert. Für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze verwenden!



5. Die Reaktionsgefäße werden verschlossen und DNA und Enzymgemisch vorsichtig gemischt, indem man leicht mit dem Finger gegen das Gefäß schlägt. Wichtig: die gesamte Flüssigkeit muss sich auf dem Gefäßboden befinden! (ggf. kurz zentrifugieren.)



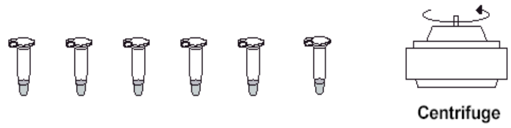
6. Die Reaktionsgefäße werden in den schwimmfähigen Kunststoffhalter gesetzt und 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (alternativ: über Nacht bei Raumtemperatur).



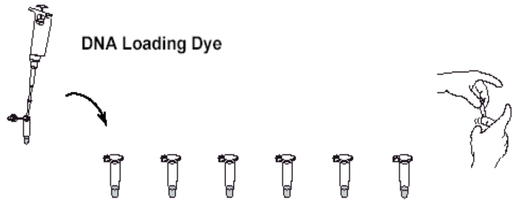
7. Die Reaktionsgefäße werden aus dem Wasserbad geholt und bei 4°C gelagert, bis der Versuch fortgesetzt wird.

3. Stunde: Agarose-Gel Elektrophorese

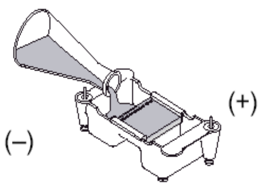
1. Die DNA Proben werden aus dem Kühlschrank geholt und überprüft, dass sich die Lösungen auf dem Gefäßboden befinden. Falls möglich, kurz zentrifugieren.



2. 5 µl Loading Dye (LD) werden mit jeweils einer neuen Pipettenspitze zu allen Ansätzen pipettiert. Die Gefäße werden verschlossen und wieder vorsichtig gemischt, indem leicht mit dem Finger gegen die Gefäßwand geschlagen wird.

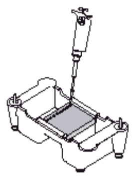


3. Ein Agarose Gel wird in die Elektrophorese-Zelle gesetzt u. die Kammer mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt ist (ca. 275 ml Puffer).



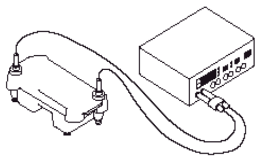
4. Es sollte überprüft werden, dass sich die Taschen in dem Gel auf der Seite der schwarzen (-) Elektrode befinden und das untere Ende des Gels in der Nähe der roten (+) Elektrode.

5. Aus jedem Reaktionsgefäß werden nun die Proben mit jeweils einer neuen Pipettenspitze in je eine Tasche des Agarose Gels pipettiert, und zwar in folgender Reihenfolge:



Spur 1: HindIII DNA Standard (M), 10 µl
Spur 2: CS, grün, 20 µl
Spur 3: S1, blau, 20 µl
Spur 4: S2, orange, 20 µl
Spur 5: S3, violet, 20 µl
Spur 6: S4, rot, 20 µl
Spur 7: S5, gelb, 20 µl

6. Der Deckel wird auf die Elektrophorese-Kammer gesetzt, das ist nur in einer Orientierung möglich, die roten u. schwarzen Kabel müssen zu den roten u. schwarzen Elektroden der Elektrophorese-Kammer passen. Die Kabel stellen die Verbindung zum Netzgerät her.



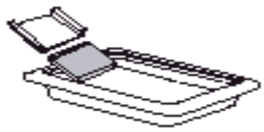
7. Am Netzgerät wird eine Spannung von 100 V eingestellt, die Laufzeit beträgt ca. 30 - 40 min.

8. Soll die Elektrophorese gestoppt werden, ist das Netzgerät auszuschalten und der Deckel von der Elektrophorese-Kammer zu entfernen. Das Gel kann nun sehr vorsichtig mit dem Gelträger aus der Kammer geholt (Achtung! Das Gel rutscht sehr schnell weg!) und in die Färbeschale überführt werden.

9. Das Gel wird mit ca. 60 ml DNA Stain gefärbt (mind. 2 h, Färbung über Nacht ist auch möglich).

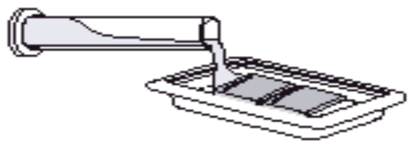
Sichtbarmachen der DNA Fragmente:

1. Ist der Elektrophoreselauf beendet, schalten Sie das Netzgerät aus und entfernen den Deckel von der Elektrophorese-Kammer. Das Gel kann nun sehr vorsichtig mit dem Gelträger aus der Kammer geholt (Achtung! Das Gel rutscht sehr schnell weg!) und in die Färbeschale überführt werden.



2. Es gibt zwei Möglichkeiten, die Färbung des Gels durchzurühren:

SCHNELL-FÄRBUNG (12 – 15 min):



a. 120 ml **100x** Fast Blast DNA Stain werden in ein Färbeschälchen gegossen (1 Schälchen für 2 Gele).

b. Die Gele werden 2 min gefärbt, dabei das Färbeschälchen leicht geschüttelt. (Der Farbstoff kann wiederverwendet werden!)

c. Waschen der Gele mit warmem Wasser (40–55 °C) für 10 sec.

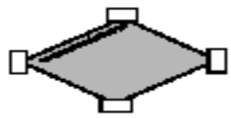


d. Entfärben der Gele durch zweimaliges Waschen mit warmem Wasser für je 5 min, dabei leicht schütteln.

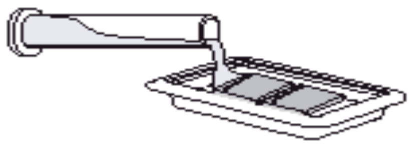
e. Ergebnisse dokumentieren.

f. Unbenutzte Spuren wegschneiden.

g. Das Gel kann auf einem Support-Film an der Luft getrocknet und aufbewahrt werden.



ÜBERNACHT-FÄRBUNG



a. 120 ml **1x** Fast Blast DNA Stain werden in ein Färbeschälchen gegossen (1 Schälchen für 2 Gele).

b. Die Gele bleiben über Nacht in der Färbelösung (wenn möglich auf einem Schüttler); eine Entfärbung ist nicht nötig.

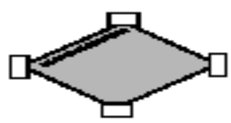
c. Sollte der Hintergrund zu stark gefärbt sein, kurz mit Wasser waschen.



d. Ergebnisse dokumentieren.

e. Unbenutzte Spuren wegschneiden.

f. Das Gel kann auf einem Support-Film an der Luft trocknen und aufbewahrt werden.



DNA-Fingerprinting

Schülerhandbuch

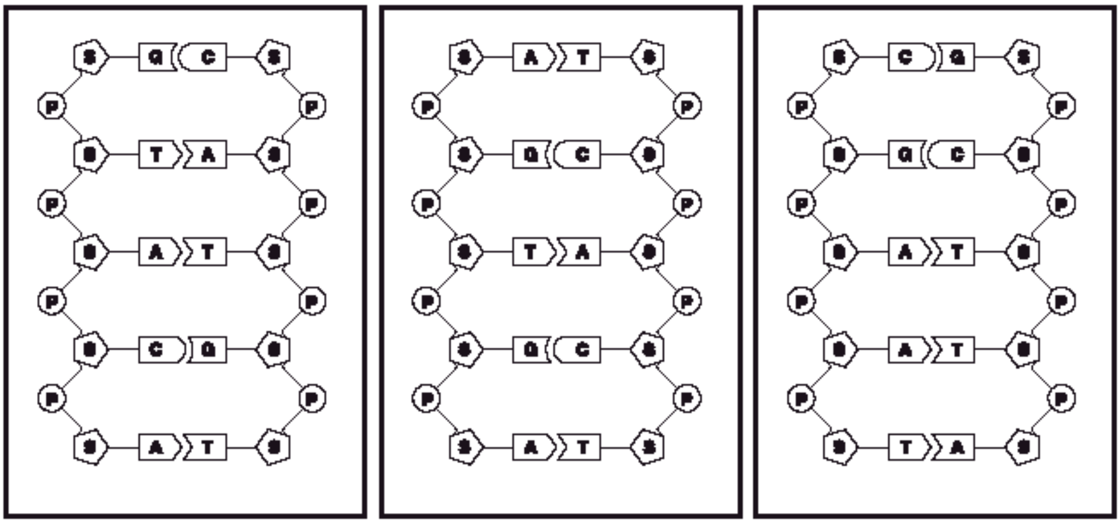
Inhalt **Seite**

1. Stunde: Einführung zum DNA-Fingerprinting

Sie werden in Kürze eine Analyse durchführen, die als DNA-Fingerprinting bekannt ist. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten, sollten Sie in der Lage sein zu entscheiden, ob die DNA-Proben von ein und demselben Individuum stammen oder von verschiedenen. Für dieses Experiment ist es wichtig, sich nochmals die Struktur der DNA ins Gedächtnis zu rufen.

DNA besteht aus einer Serie von Stickstoffbasen, die durch schwache Wasserstoffbrücken-Bindungen zusammengehalten werden. Diese Basenpaare sind eine nach der anderen an das Zucker-Phosphat-Rückgrat gebunden. Die vier Stickstoffbasen sind Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin (A, T, G und C). Erinnern Sie sich an die Basenpaar-Regel: A-T und G-C. Siehe Abbildung unten zum DNA-Molekül:

Die Struktur der DNA



DNA Molekül I Pflanze

DNA Molekül II Mensch

DNA Molekül III Bakterium

Die oben abgebildeten Molekülstrukturen stellen nur einen sehr kleinen Teil der DNA von drei verschiedenen Individuen dar. In dieser Darstellung der DNA wurden folgende Symbole verwendet:

Seitenketten:

S = **ZUCKER**molekül mit fünf Kohlenstoffatomen, bekannt als Desoxyribose

P = **PHOSPHAT**molekül bestehend aus Phosphor und Sauerstoffatomen

DNA Nukleotidbasen:

A = Adenin **C** = Cytosin **G** = Guanin **T** = Thymin

Die Analyse der drei DNA-Proben (siehe nächste Seite) kann möglicherweise helfen, Ähnlichkeiten und Unterschiede in den DNA-Proben verschiedener Personen zu erkennen.

1. Stunde: Einführung zum DNA-Fingerprinting

<u>Vorüberlegung 1</u>: Was sind die typischen Strukturmerkmale der DNA?

1. Vergleichen Sie das „Rückgrat“ aus Zucker- und Phosphatbausteinen in allen drei oben abgebildeten Seitenketten. Gibt es irgendwelche Unterschiede?

2. Enthalten alle drei Proben der obigen Abbildung dieselben Basen? Beschreiben Sie Ihre Beobachtungen.

3. Sind die Basen in allen drei Proben in gleicher Weise gepaart? Beschreiben Sie das Muster der Basenpaarung.

4. Welche Annahmen können Sie bei Ihrem Versuch, die DNA-Proben von drei verschiedenen Individuen zu analysieren, über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der DNA-Proben machen?

5. Was genau muß zwischen diesen Proben verglichen werden, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sie identisch sind oder nicht?

2. Stunde: Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen

Vorüberlegung 2: Wie können wir Unterschiede bei den Basensequenzen feststellen?

Auf den ersten Blick erscheint diese Aufgabe ziemlich schwierig. Es muß nämlich bestimmt werden, ob die **lineare** Basen**sequenz** von verschiedenen DNA-Proben identisch ist oder nicht. Hier könnte vielleicht die Erkenntnis aus einigen relativ neuen **Entwicklungen bei Techniken mit rekombinanter DNA** helfen, einen strategischen Plan zu entwickeln.

1968 entdeckten Dr. Werner an der Universität Basel, Schweiz und Dr. Hamilton Smith an der Johns Hopkins Universität, Baltimore, eine Gruppe von Enzymen in Bakterien, die, wenn sie zu irgendeiner DNA gegeben wurden, zwischen bestimmten Nukleotidbasen (**Erkennungsstellen**) zu einer Spaltung (**Hydrolyse**) der Zuckerphosphatbindungen führen. Dies wiederum führt dazu, daß der Doppelstrang der DNA an der Erkennungsstelle bricht und das DNA-Molekül in zwei Teile gespalten wird. Diese Molekülscheren oder „Schneide"-Enzyme nennt man Restriktions-Endonukleasen.

[Können Sie es sich erklären, warum sie Restriktionsendonukleasen genannt werden?]

Zwei häufige Restriktionsendonukleasen sind *Eco*RI und *Pst*I, die Sie in diesem Experiment erhalten. Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von *Eco*RI und *Pst*I im DNA-Fingerprintingtest, muß man erst den Schneideeffekt der Restriktionsendonukleasen an der DNA verstehen und sich vor Augen führen:



Die durch die Basenpaare gezogene Linie repräsentiert die Stellen, an denen Bindungen gespalten werden, wenn eine Restriktionsendonuklease die Sequenz **GAATCC** erkennt. Die folgenden analytischen Fragen beziehen sich auf das weitere Schicksal eines DNA-Moleküls, nachdem es von einer Restriktionsendonuklease in der oben gezeigten Art und Weise „geschnitten" wurde.

1. Wie viele DNA-**Stücke** würden bei diesem Schnitt entstehen? _______________

2. Schreiben Sie die **Basensequenz** sowohl des rechten als auch des linken DNA-Fragments auf.

   Links: **Rechts**:

3. Welche Unterschiede bestehen zwischen diesen beiden Fragmenten?

4. Die Größe eines DNA-Fragments kann durch die Anzahl der Basenpaare in diesem Fragment ausgedrückt werden. Geben Sie die Größe der Fragmente an. (Notieren Sie alle Abweichungen, die Sie entdecken können.)

a) Das kleinere Fragment besteht aus _______ Basenpaaren (Bp).

b) Wie lang ist das längere Fragment?________

5. Betrachten Sie die beiden unten gezeigten DNA-Proben- der Einfachheit halber sind nur Einzelstränge abgebildet:

Probe Nr.1
C A G T G A T C T C G A A T T C G C T A G T A A C G T T

Probe Nr.2
T C A T G A A T T C C T G G A A T C A G C A A A T G C A

Geben Sie für den Fall, daß beide Sequenzen mit einem Restriktionsenzym mit der Erkennungssequenz GAATTC behandelt werden, die Anzahl und Größe der sich ergebenden Fragmente an.

Probe Nr.1	**Probe Nr.2**
Anzahl der Fragmente:_______	Anzahl der Fragmente: ______

Listen Sie die Fragmente der Größe nach auf (das größte zuerst):

Probe Nr.1	**Probe Nr.2**

2. Stunde: Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen

Experimenteller Teil

Bei sorgfältiger Analyse wird klar, daß der einzige Unterschied zwischen der DNA verschiedener Individuen in der linearen Sequenz ihrer Basenpaare besteht. Im Labor erhält Ihr Team 6 DNA-Proben. Zur Erinnerung, die Aufgabe besteht darin, herauszufinden, ob eine davon vom gleichen Individuum kommt oder ob sie von verschiedenen Individuen stammen.

Bisher hat die vorläufige Analyse folgende Erkenntnisse gebracht:

- Die Ähnlichkeiten und Unterschiede der DNA verschiedener Individuen.

- Wie Restriktionsendonukleasen DNA-Moleküle schneiden [hydrolysieren].

- Wie die Zugabe derselben Restriktionsendonuklease zu zwei verschiedenen DNA-Proben zu Erkenntnissen über bestehende Unterschiede bei der linearen Basensequenz verhelfen kann.

Nachdem diese drei Punkte geklärt sind, können Sie jetzt mit dem ersten Schritt der DNA-Fingerprinttechnik beginnen, nämlich der Durchführung eines Verdaus der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen.

Checkliste (✓) für den Arbeitsplatz

Vergewissern Sie sich, daß alle unten angeführten Materialen vor Versuchsbeginn am Arbeitsplatz vorhanden sind.

Schülerarbeitsplätze (8)	Anzahl	(✓)
Agarosegel-Elektrophorese System (Elektrophorese-Kammer, Gelgießstand, 8-Well Kamm)	1	❑
*Eco*RI/*Pst*I Enzym-Mix	1 Reaktionsgefäß (80 µl)	❑
Pipettenspitzen, 2-200 µl	15 Spitzen	❑
Mikropipette, 2-20 µl	1	❑
Farbcodierte Reaktionsgefäße: grün, blau, orange, violett, rot, gelb	1	❑
Filzschreiber	1	❑
Abfallbehälter	1	❑
Reaktionsgefäßständer aus Styropor	1	❑
Laborklebeband (nicht Marke Scotch 3M oder ein ähnliches Band)	1	❑

Arbeitsplatz der Lehrkraft		
DNA vom Tatort, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.1, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.2, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.3, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.4, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
DNA vom Tatverdächtigen Nr.5, mit Puffer, rehydriert	1 Fläschchen	❑
Geschmolzene 1%ige Agarose in 1x TAE (siehe Unterrichtsvorbereitung)	40-50 ml/Gel	❑
Brutschrank oder Wasserbad (37°C) - optional	1 / Klasse	❑
Mikrozentrifuge oder	1 / Klasse	❑
Minizentrifuge	4 / Klasse	❑

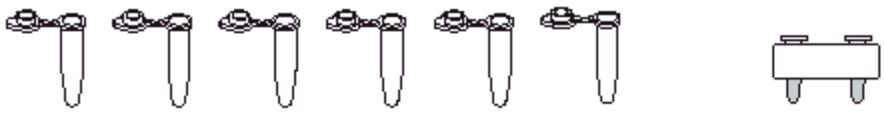
2. Stunde Labor: Restriktionsverdau der DNA-Proben

1. Beschriften der Reaktionsgefäße

A. Holen Sie sich je eines der folgenden farbigen Reaktionsgefäße. Beschriften Sie die 5 farbigen Reaktionsgefäße wie folgt:

Grün	TO (Tatort)
Blau	V1 (Tatverdächtiger Nr. 1)
Orange	V2 (Tatverdächtiger Nr. 2)
Violett	V3 (Tatverdächtiger Nr. 3)
Rot	V4 (Tatverdächtiger Nr. 4)
Gelb	V5 (Tatverdächtiger Nr. 5)

Schreiben Sie Ihren Namen und die Kursbezeichnung auf die Reaktionsgefäße! Der Restriktionsverdau findet in diesen Gefäßen statt. Behalten Sie diese Gefäße auf Ihrem Arbeitsplatz.



TO V1 V2 V3 V4 V5

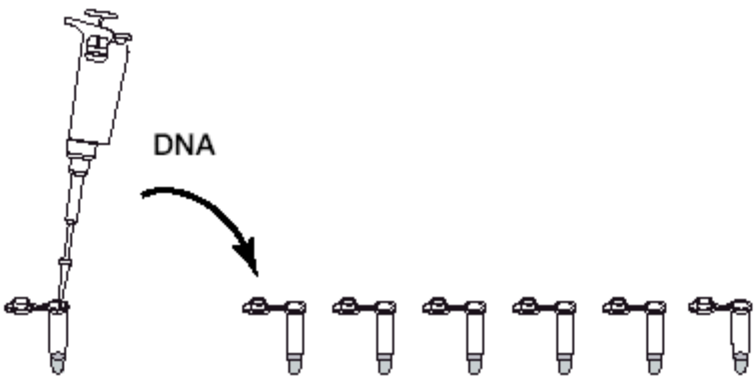
2. Holen Sie sich das farblose Reaktionsgefäß mit der Aufschrift „ENZ“

ENZ = Enzymmischung.



3. Holen Sie sich Ihre DNA-Proben.

   Pipettieren Sie je 10 µl jeder DNA-Probe aus der farbigen Stammlösung in jedes entsprechend gekennzeichnete und gefärbte Reaktionsgefäß. Verwenden Sie dabei für jede Probe eine frische Pipettenspitze.



DNA-Stammlösung TO V1 V2 V3 V4 V5

Beobachtungen

1. Beschreiben Sie die physikalische Eigenschaften der DNA-Proben.

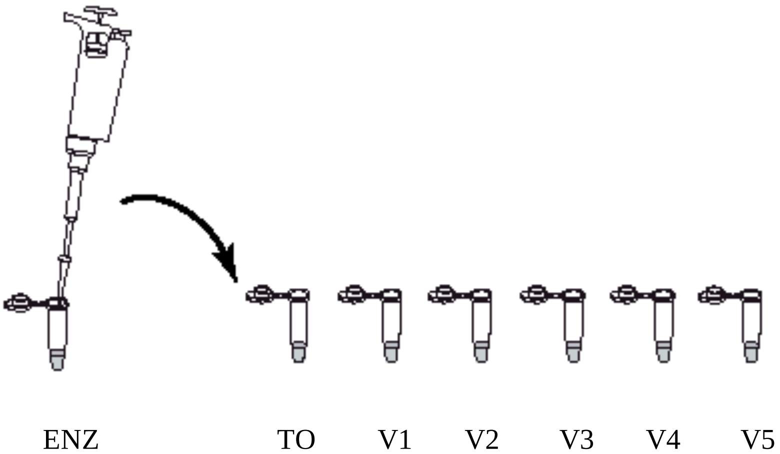
2. Können Sie irgendwelche Unterschiede zwischen den DNA-Proben feststellen?

3. Beschreiben Sie das Aussehen der Restriktionsendonukleasemischung.

4. Kombinieren Sie die Lösungen und lassen Sie sie reagieren.

   Pipettieren Sie mit einer Mikropipette und jeweils frischen Pipettenspitzen je 10 µl der Enzymmischung "ENZ" zu einem Reaktionsgefäß nach dem unten angegebenen Schema.

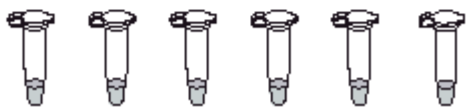
   Hinweis: Wechseln Sie jedesmal wenn Sie zu einem anderen Reagenz übergehen die Pipettenspitze; ebenso falls Sie versehentlich mit der Pipettenspitze die Flüssigkeit in einem der Reaktionsgefäße berühren. Im Zweifelsfall lieber die Pipettenspitze wechseln. Die DNA kommt vor dem Enzym in das Reaktionsgefäß. Das Enzym wird immer zuletzt zugegeben.



Die Reaktionsgefäße mit den DNA-Proben sollten jetzt folgendes enthalten:

DNA-Proben (je 10 µl)	***Eco*RI/*Pst*I Enzymmischung**	**gesamtes Reaktionsvolumen**
Tatort (TO)	10 µl	20 µl
Tatverdächtiger Nr. 1(V1)	10 µl	20 µl
Tatverdächtiger Nr. 2(V2)	10 µl	20 µl
Tatverdächtiger Nr. 3(V3)	10 µl	20 µl
Tatverdächtiger Nr. 4(V4)	10 µl	20 µl
Tatverdächtiger Nr. 5(V5)	10 µl	20 µl

5. Mischen Sie den Inhalt aller Reaktionsgefäße.
   Schließen Sie bei allen Reaktionsgefäßen den Deckel. Mischen Sie die Komponenten, indem Sie mit den Finger leicht gegen die Reaktionsgefäße schnipsen. Steht eine Mikrozentrifuge zur Verfügung, kann sie dazu benutzt werden, alle Flüssigkeit durch kurzes (2 Sekunden) Zentrifugieren auf dem Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln und so zu kombinieren und mischen. (Die Reaktionsgefäße müssen gegeneinander **austariert** in den Rotor positioniert werden.). Ist keine Zentrifuge verfügbar, schlagen Sie die Reaktionsgefäße wie ein Thermometer nach unten aus (einmal reicht). Indem man die Gefäße leicht auf die Laborbank klopft, wird der Inhalt auch kombiniert und gemischt.



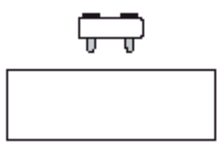
TO V1 V2 V3 V4 V5



schnipsen oder 1x ausschlagen

6. Inkubation der Proben

   Setzen Sie die Reaktionsgefäße in einen schwimmenden Reaktionsgefäßständer und inkubieren Sie die Proben 45 Minuten bei 37°C. Alternativ können die Proben auch in einem großen Volumen 37°C warmen Wassers über Nacht inkubiert werden (das Wasser kühlt hierbei langsam auf Raumtemperatur ab). Nach der Inkubation werden die Proben bis zur nächsten Laborstunde im Kühlschrank aufbewahrt.



Wasserbad

Hinweis: Während Sie warten, haben Sie genug Zeit, ein Agarosegel zu gießen, es sei denn sie wurden für Sie schon vorbereitet. Fragen Sie Ihren Lehrer.

2. Stunde: Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen

Abschlußfragen

1. Beschreiben Sie alle sichtbaren Veränderungen des Inhalts der DNA-Proben, nachdem diese mit den Restriktionsenzymen versetzt, aber noch nicht inkubiert worden sind.

2. Können Sie irgendwelche Anzeichen dafür erkennen, daß die DNA-Proben durch die Zugabe von *Eco*RI/*Pst*I fragmentiert oder sonstwie verändert wurden? Erklären Sie Ihre Antwort.

3. Ist es möglich, daß die DNA-Proben fragmentiert wurden, obwohl es keine erkennbaren Anzeichen dafür gibt? Begründen Sie Ihre Antwort.

4. (Am nächsten Tag zu beantworten)

Gibt es nach der **24-stündigen Inkubation** irgendwelche Anzeichen dafür, daß die Restriktionsenzyme die DNA in einem der Reaktionsgefäße verändert haben könnten? Begründen Sie Ihre Antwort.

3. Stunde: Elektrophorese und Anfärben der DNA-Proben

Vorüberlegung 3: Wie lassen sich die Positionen der *Eco*RI und *Pst*I Restriktionsschnittstellen auf den DNA-Proben feststellen?

Da wir versuchen, Änderungen auf der molekularen Ebene festzustellen und es keine sichtbaren Anzeichen gibt, die wir analysieren könnten, scheint diese Aufgabe unsere Fähigkeiten zu übersteigen und nicht lösbar zu sein. Lassen Sie es uns aber dennoch versuchen. Eine Möglichkeit, die Lage der Restriktionsstellen zu bestimmen, könnte in der Beantwortung folgender Fragen liegen:

1. Wie viele verschiedene Größen von DNA-Fragmenten gibt es in jeder Probe?

2. Wie groß ist jedes Fragment, relativ gesehen?

Es muß daher versucht werden, eine Antwort auf folgenden Frage zu bekommen: Liegen die Restriktionsschnittstellen von *Eco*RI und *Pst*I bei irgendwelchen DNA-Proben an den gleichen Stellen?

Die folgende Informationen helfen, den tatsächlichen Größenbereich der DNA-Fragmente Ihrer Proben zu bestimmen.

Analyse der Spaltungen mit Restriktionsenzymen.

Die dreidimensionale Struktur der Restriktionsenzyme erlaubt es ihnen, sich an eine doppelsträngiges DNA-Molekül zu binden und an der Helix entlang zu gleiten, bis sie eine spezifische Basenpaarsequenz erkennen, die das Enzym anhalten läßt. An dieser Stelle, die Restriktionsschnittstelle genannt wird, verdauen (spalten chemisch) die Enzyme dann das DNA-Molekül – sie haben also gewissermaßen die Funktion von molekularen Scheren, die die DNA an bestimmten Basenpaarsequenzen schneiden.

Kommt eine spezifische Restriktionsschnittstelle mehr als einmal in einem DNA-Molekül vor, so wird das entsprechende Restriktionsenzym an allen diesen Stellen einen Schnitt vornehmen und es entstehen mehrere Fragmente. Wenn also ein vorgegebenes lineares DNA-Stück mit einem Restriktionsenzym geschnitten wird, dessen spezifische Erkennungssequenz an fünf verschiedenen Stellen auf dem DNA-Molekül zu finden ist, gibt es sechs Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Länge der einzelnen Fragmente hängt davon ab, wo auf dem DNA-Molekül sich die Restriktionsschnittstellen befinden.

Werden Restriktionsenzyme dazu benutzt, einen langen DNA-Strang zu schneiden, können Fragmente unterschiedlicher Größe entstehen. Diese Fragmente können durch einen **Agarose Gelelektrophorese** genannten Prozeß aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Die Begriff Elektrophorese steht dabei für: *Wanderung unter Einfluß elektrischer Spannung*. Bei der Elektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer relativen Größe getrennt. Die DNA-Fragmente werden in eine Agarose Trenngel geladen, das in eine Kammer kommt, die mit einer elektrisch leitenden Pufferlösung gefüllt ist. Zwischen zwei Drahtelektroden an den beiden Enden der Kammer wird Gleichstrom angelegt. DNA-Fragmente sind negativ geladen und werden daher im elektrischen Feld vom positiven Pol (Anode) angezogen. Die Matrix des Agarosegels dient dabei als molekulares Sieb, durch das kürzere DNA-Fragmente leichter hindurchwandern können als größere. Pro Zeiteinheit wandern kleinere Fragmente weiter als größere. Fragmente der gleichen Größe bleiben zusammen und wandern in separaten DNA-„Banden“. Diese Banden kann man im Gel sehen, nachdem die DNA angefärbt wurde.

Ein Vergleich: Dieser Vorgang kann mit einer Situation im Klassenzimmer verglichen werden, indem alle Tische und Stühle willkürlich zusammengeschoben wurden. Ein einzelner Schüler kann sich durch das Stuhl- und Tischelabyrinth relativ schnell und ohne große Probleme durchwinden, während eine Kette von vier Schülern länger bräuchte und mehr Probleme hätte, sich den Weg durch den Irrgarten zu bahnen. Versuchen Sie es!

3. Stunde: Elektrophorese der DNA-Proben

Labor Checkliste (✓)

Schülerarbeitsplätze	**Anzahl/Arbeitsplatz**	**(✓)**
Agarosegel-Elektrophorese System	1	❑
Agarose Gel	1	❑
Verdaute DNA-Proben	6	❑
HindIII/Lambda Verdau (DNA-Marker)	1	❑
DNA-Frontmarker (Sample Loading Dye)	1	❑
Filzschreiber (Permanent Marker)	1	❑
Pipettenspitzen, 2-20 µl	13	❑
Mikropipette, 2-20 µl	1	❑
Abfallbehälter	1	❑
Gel Support Film (ggf.)*	1	❑
Fast Blast DNA-Anfärbelösung 1x oder 100x*	120 ml pro 2 Arbeitsplätze	❑
Große Behälter zum Entfärben (ggf.)*	1-3 pro 2 Arbeitsplätze	❑
Reaktionsgefäßständer aus Styropor	1	❑
Netzgerät	1	❑
Gelfärbeschale	1 pro 2 Arbeitsplätze	❑
1x TAE Elektrophoresepuffer	275 ml Gel/Kammer	❑

Arbeitsplatz der Lehrkraft

Mikrozentrifuge	1	❑
oder Minizentrifuge (optional)	4	❑
Schüttler	1	❑

* Je nachdem, ob die Schnellfärbung oder die Über-Nacht-Färbung verwendet wird.

3. Stunde Labor: Elektrophorese der DNA-Proben

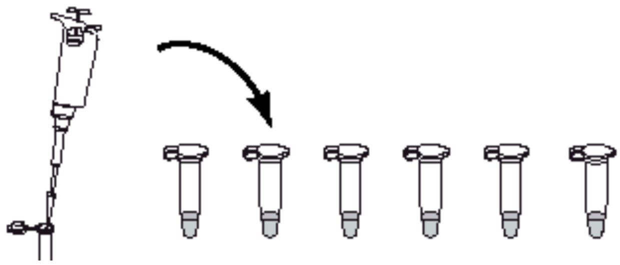
1. Holen Sie sich ein bereits gegossenes Agarosegel von Ihrer Lehrkraft, oder gießen Sie auf Anweisung Ihrer Lehrkraft Ihr eigenes Gel.

2. Nehmen Sie anschließend die verdauten DNA-Proben aus dem Kühlschrank.

Pipettieren Sie in jedes Reaktionsgefäß 5 µl der Frontmarkerlösung „FM“, wobei Sie für jede Probe eine frische Pipettenspitze verwenden.

DNA-Proben	Frontmarker
Tatort (TO)	5 µl
Tatverdächtiger Nr.1 (V1)	5 µl
Tatverdächtiger Nr.2 (V2)	5 µl
Tatverdächtiger Nr.3 (V3)	5 µl
Tatverdächtiger Nr.4 (V4)	5 µl
Tatverdächtiger Nr.5 (V5)	5 µl

Frontmarkerlösung



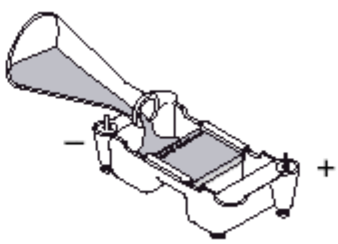


FM TO V1 V2 V3 V4 V5 schnipsen oder 1x ausschlagen

Schließen Sie bei allen Reaktionsgefäßen den Deckel. Mischen Sie die Komponenten, indem Sie leicht mit dem Finger gegen das Reaktionsgefäß schnipsen. Ist eine Mikrozentrifuge verfügbar, kann durch kurzes Zentrifugieren alle Flüssigkeit am Boden der Reaktionsgefäße gesammelt werden. Andernfalls klopfen Sie dazu die Reaktionsgefäße sanft auf den Tisch.

3. Setzen Sie den Gelträger mit dem darin fest gewordenen Gel auf die Plattform in der Elektrophoresekammer. Die Geltaschen kommen dabei ans (-) Kathodenende der Kammer mit dem schwarzen Anschlußkabel. Entfernen Sie ganz vorsichtig den Gelkamm, indem Sie ihn gerade nach oben abziehen.

4. Gießen Sie ca. 275 ml Elektrophoresepuffer in die Elektrophoresekammer. Füllen Sie soviel Puffer ein, bis die Geltaschen **knapp bedeckt** sind.

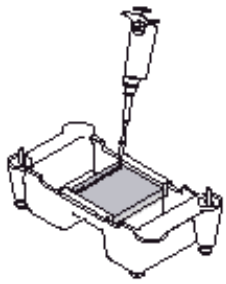


5. Legen Sie das mit „M“ markierte Reaktionsgefäß mit den Lambda *Hind*III DNA-Größenmarker bereit.

Gele werden von links nach rechts gelesen. Die erste Probe wird also in der Geltasche in der linken Ecke des Gels aufgetragen.

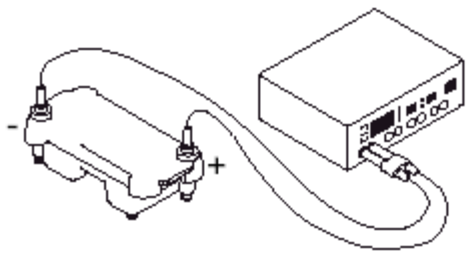
6. Unter Verwendung einer neuen Pipettenspitze für jede Probe beladen Sie Ihr Gel folgendermaßen:

Bahn 1	*Hind*III Größenmarker, farblos, 10 µl
Bahn 2	TO, grün, 20 µl
Bahn 3	V1, blau, 20 µl
Bahn 4	V2, orange, 20 µl
Bahn 5	V3, violett, 20 µl
Bahn 6	V4, rot, 20 µl
Bahn 7	V5, gelb, 20 µl



7. Setzen Sie den Deckel auf die Elektrophoresekammer. Der Deckel paßt nur in einer Orientierung auf das Unterteil: rot gehört zu rot, schwarz zu schwarz. Verbinden Sie die Elektroden mit dem Netzgerät.

8. Schalten Sie das Netzgerät ein. Stellen Sie die Spannung auf 100 V ein und lassen Sie die Elektrophorese 30 – 40 Minuten lang laufen.



Während das Gel läuft, können Sie mit der Beantwortung der Fragen auf der folgenden Seite beginnen.

9. Ist die Elektrophorese beendet, schalten Sie das Netzgerät ab und entfernen den Deckel von der Elektrophoresekammer. Nehmen Sie vorsichtig den Gelträger mit dem Gel aus der Elektrophoresekammer heraus. Vorsicht, das Gel ist sehr glitschig.

10. Bitte gehen Sie auf Seite 39. Dort finden Sie die genaue Anleitung zur Färbung Ihrer Gele.

3. Stunde: Elektrophorese der DNA-Proben

Abschlußfragen

1. Das Elektrophoresegerät erzeugt ein elektrisches Feld mit positiven und negativen Polen an den Enden des Gels. DNA-Moleküle sind negativ geladen. Zu welchem Pol des elektrischen Feldes wird die DNA Ihrer Meinung nach wandern (+ oder -)? Erklären Sie Ihre Antwort.

2. Welche Farbe steht für den negativen Pol?

3. Nachdem die DNA-Proben in die Starttaschen geladen wurden, werden sie „gezwungen“ durch die Gelmatrix zu wandern. Welche Fragmente wandern am schnellsten zum anderen Ende des Gels (große oder kleine)? Begründen Sie Ihre Antwort.

4. Welche Fragmente wandern die kürzeste Strecke – von den Geltaschen aus gesehen? Begründen Sie Ihre Meinung.

4. Stunde Labor: Anfärbung der DNA mit Fast Blast DNA-Färbung

Vorüberlegung 4: Sind irgendwelche DNA-Proben der Tatverdächtigen identisch mit der am Tatort sichergestellten DNA-Probe?

Nehmen Sie sich einen Moment Zeit, darüber nachzudenken, wie Sie Ihr Gel analysieren werden? In den beiden letzten Schritten werden Sie:

A. Die DNA-Fragmente in Ihrem Gel sichtbar machen.

B. Die Anzahl und Lage der sichtbaren DNA-Banden im Gel analysieren.

Sichtbarmachen der DNA-Fragmente

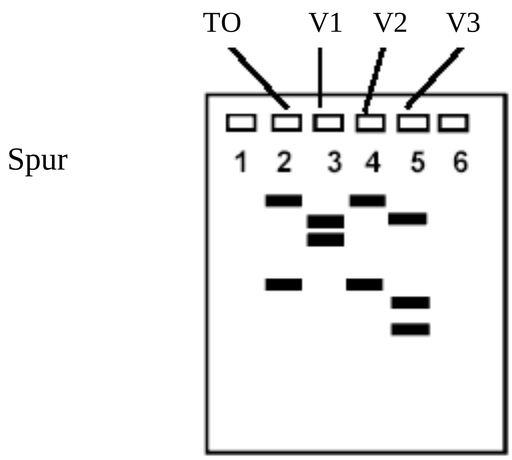
Da die DNA farblos ist, kann man sie im Gel nicht sofort sehen. Ohne weitere Hilfsmittel sind auf den Gelen nur die Positionen der Frontmarker, nicht aber die der DNA-Fragmente zu erkennen. Die DNA-Fragmente werden durch Anfärben des Gels mit dem blauen „Fast Blast DNA-Farbstoff" sichtbar gemacht. Die blauen Farbstoffmoleküle sind positiv geladen und haben eine hohe Affinität zur DNA. Diese blauen Farbstoffmoleküle binden sich sehr fest an die DNA-Fragmente, so dass diese dadurch sichtbar werden. Die sichtbaren DNA-Fragmente können anschließend abgepaust, fotografiert oder abgezeichnet werden. Außerdem können die Gele mit den DNA-Fragmenten in getrockneter Form zur Analyse aufgehoben werden.

Die unten abgebildete Zeichnung ist ein Beispiel eines getrockneten Gels nach der Elektrophorese. Für die Fingerprinting Analyse ist es wichtig, sich an folgende Tatsachen zu erinnern:

- Jede Bahn enthält eine andere DNA-Probe.

- Jede DNA-Probe wurde mit denselben Restriktionsendonukleasen behandelt.

Analysieren Sie die DNA-Banden in der unten abgebildeten Zeichnung eines Geles und beantworten Sie die Fragen auf der folgenden Seite.



4. Stunde: Verständnisfragen

1. Was ist höchstwahrscheinlich in jeder Bande enthalten?

2. Angenommen dies wäre ein Fingerprinting Gel, wieviele DNA-Proben erwarten Sie in jeder separaten Bahn?

3. Was wäre eine logische Erklärung dafür, dass für alle DNA-Proben mehr als eine Bande zu sehen ist?

4. Wodurch entstanden die DNA-Fragmente?

5. Welche DNA-Proben hatten für die verwendeten Restriktionsendonukleasen die gleiche Anzahl an Schnittstellen? Schreiben Sie die Nummern der entsprechenden Bahnen auf.

6. Welche Probe weist das kleinste DNA-Fragment auf?

7. Geht man von einer ringförmigen DNA aus (Plasmid), die als Startmaterial eingesetzt wurde, wie viele Restriktionsschnittstellen hatte dann Bahn 3?

8. Welche DNA-Proben wurden anscheinend in Fragmente von gleicher Anzahl und Größe geschnitten?

9. Welche Schlussfolgerungen bezüglich der DNA-Proben in der Abbildung ziehen Sie auf Grund Ihrer Gelanalyse? Stammen irgendwelche Proben anscheinend aus der gleichen Quelle? Wenn ja, welche? Erläutern Sie Ihre Schlussfolgerung.

Gel-Färbe- und Entfärbungsschritte

Es gibt zwei verschiedene Protokolle, um DNA mit der Fast Blast Färbung sichtbar zu machen: Um Gele sehr schnell innerhalb von 12-15 Minuten zu färben, verwenden Sie bitte Protokoll I, zur Färbung über Nacht wählen Sie Protokoll II. Ihre Lehrkraft wird abhängig von der verfügbaren Zeit entscheiden, welches Protokoll verwendet wird. Zwei Schülerteams pro Färbeschale werden die Gele färben (die Ecken der Gele sind so abzuschneiden, dass man sie voneinander unterscheiden kann). Beschriften Sie die Gelfärbeschalen mit Initialen und der Klasse bevor Sie mit der Färbung beginnen.
Achtung: Die Fast Blast DNA-Färbelösung ist ungiftig und nicht krebserregend. Trotzdem sollten Vinyl- bzw. Latexhandschuhe und Schutzkleidung getragen werden, wenn mit der Färbelösung oder gefärbten Gelen hantiert wird. Damit vermeiden Sie eine Anfärbung der Hände und der Kleidung.

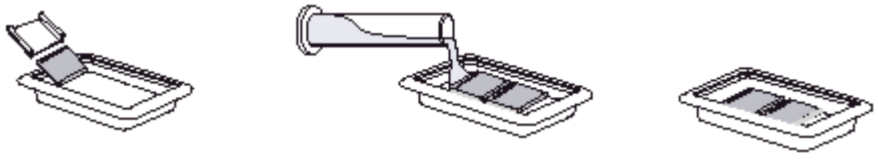
Protokoll I: Schnelle Färbung von Agarose Gelen in 100x Fast Blast DNA-Färbelösung

Mit diesem Protokoll können DNA Banden innerhalb von 15 Minuten sichtbar gemacht werden. Dazu muss die Fast Blast DNA-Färbelösung (500x) auf eine **100x** Konzentration verdünnt werden. Wir empfehlen 120 ml verdünnte 100 x Fast Blast-Lösung, um zwei Gele von 7x7 oder 7x10 cm in einer Färbeschale anzufärben, die im Bio-Rad Klassenzimmer-Kit enthalten sind. Wenn Sie andere Färbeschalen verwenden, nehmen Sie bitte eine ausreichende Menge Färbelösung, so dass das Gel vollständig bedeckt ist.

Zum Anfärben wird das Gel aus dem Gelträger genommen. Dies geht leicht, indem sie mit einer Hand das untere Ende des Gels halten, während sie mit der anderen Hand das Gel vorsichtig mit dem Daumen herausdrücken. Besondere Aufmerksamkeit muss der Unterstützung des Gelteils gewidmet werden, der die Starttaschen enthält, da das Gel leicht der Startlinie entlang bricht. Wir empfehlen, einen Spatel oder eine andere Auflagefläche zu verwenden, wenn das Gel von einem Behälter in einen anderen überführt wird. Zum Entfärben benötigen Sie einen Behälter für jedes Schülerteam, der mindestens 500 ml faßt. Jedes Team kann einen Behälter nehmen, der nach jedem Waschschritt geleert wird oder unterschiedliche Behälter für die einzelnen Waschschritte.

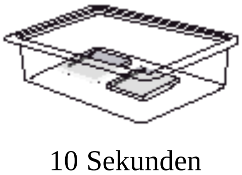
1. Markieren Sie die Färbeschalen mit Ihren Initialen und der Klasse. Sie färben zwei Gele in einer Schale.

2. Färbung der Gele
   Lassen Sie die Gele vom Gelträger in die Färbeschale gleiten. Gießen Sie ca. 120 ml der 100x Färbelösung in die Färbeschale. Wenn nötig, geben Sie mehr Färbemittel hinzu, bis das Gel komplett bedeckt ist. Färben Sie das Gel für 2-3 Minuten, aber nicht länger als 3 Minuten. Gießen Sie die 100x Lösung mit einem Trichter in eine Aufbewahrungsflasche. **Die 100x Fast Blast Färbelösung kann mindestens 7x verwendet werden.**



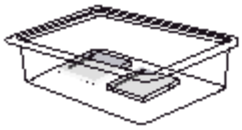
2-3 Minuten

3. Gele ausspülen
   Lassen Sie die Gele in einen Behälter gleiten, der 500-700 ml sauberes, warmes Leitungswasser (40-55 °C) enthält. Bewegen Sie das Gel sanft im Wasser für ca. 10 Sekunden.



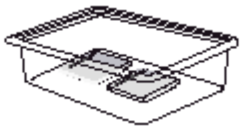
10 Sekunden

4. Gele waschen
   Lassen Sie die Gele in einen Behälter gleiten, der 500-700 ml sauberes, warmes Leitungswasser (40-55 °C) enthält. Bewegen Sie das Gel auf einem Schüttler für 5 Minuten. Wenn kein Schüttler vorhanden ist, bewegen Sie die Gele einmal pro Minute leicht im Wasser.



5 Minuten

5. Wiederholen Sie Schritt 4.



5 Minuten

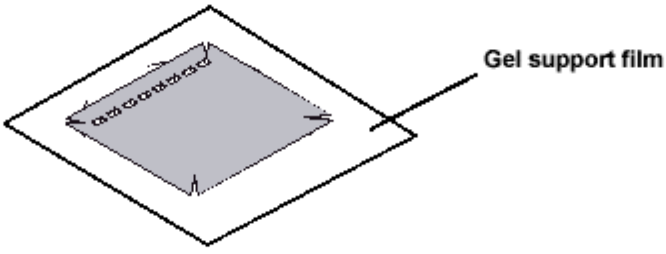
6. Aufzeichnen der Ergebnisse:

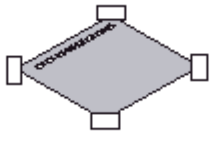
   Gießen Sie das Wasser ab und untersuchen Sie die gefärbten Gele nach zu erwarteten DNA-Banden. Nach dem 2. Waschschritt können die DNA-Banden unscharf sein. Sie werden innerhalb von 5-15 Minuten schärfer. Das kommt von Fast Blast Molekülen, die in das Gel wandern und sich fester an die DNA binden.
   Um einen möglichst großen Kontrast zu bekommen, kann es nötig sein, zusätzliche Waschschritte mit warmem Wasser durchzuführen. Entfärben Sie bis zum gewünschten Ergebnis, aber lassen Sie das Gel nicht über Nacht im Wasser. Wenn Sie die Entfärbung nicht abschließen können, geben Sie das Gel in 1x Fast Blast-Färbemittel für die Färbung über Nacht. Siehe Protokoll II.

   a. Legen Sie das Gel auf einen hellen Hintergrund und zeichnen Sie Ihre Ergebnisse in einem Diagramm wie folgt auf: Legen Sie ein durchsichtiges Blatt aus Kunststoff oder Acetat über das Gel. Mit einem Permanentmarker zeichnen Sie die Wells und Bandenmuster auf das Kunststoffblatt um eine Kopie Ihres Gels zu bekommen. Entfernen Sie das Kunststoffblatt für eine spätere Analyse. Alternativ können Gele auch auf einem gelben Stück (für einen optimalen Kontrast) eines transparenten Films fotokopiert werden.

   b. Trocknen Sie das Agarosegel als einen dauerhaften Beleg Ihres Experimentes:

      i. Schneiden Sie alle leeren Bahnen des Gels mit einem Messer oder mit einer Rasierklinge ab. Schneiden Sie die unbenutzten Spuren in Ihrem Gel von oben bis unten ab, so dass nur die Spuren 1-4 übrig bleiben.
      ii. Legen Sie das Gel auf die **hydrophile** Seite des Gel Support Films. (Auf der hydrophoben Seite des Gel Support Films bilden sich Wassertropfen.) Legen Sie das Gel in die Mitte des Films und entfernen Sie Luftblasen, die sich zwischen Gel und Film gebildet haben. Legen Sie den Film auf ein Papiertuch und lassen Sie das Gel an einer gut belüfteten Stelle trocknen. Vermeiden Sie direkte Lichteinwirkung. Während des Trocknens bindet sich das Gel an den Film, schrumpft aber nicht. Der Trocknungsvorgang ist nach 2-3 Tagen bei Raumtemperatur abgeschlossen. Das Ergebnis ist ein transparenter und dauerhafter Beleg über das Experiment.





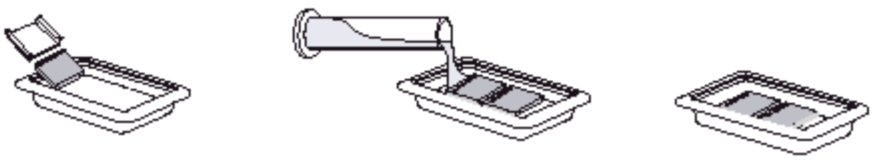
Protokoll II: Färbung über Nacht in 1x Fast Blast DNA-Färbelösung

Zur Färbung über Nacht muss die Fast Blast DNA-Färbelösung (500x) auf eine **1x** Konzentration verdünnt werden. Wir empfehlen 120 ml verdünnte 1x Fast Blast-Lösung, um zwei Gele von 7x7 cm oder 7x10 cm in einer Färbeschale anzufärben. Wenn Sie andere Färbeschalen verwenden, nehmen Sie bitte eine ausreichende Menge Färbelösung, so dass das Gel vollständig bedeckt ist.

Zum Anfärben wird das Gel aus dem Gelträger genommen. Dies geht leicht, indem sie mit einer Hand das untere Ende des Gels halten, während sie mit der anderen Hand das Gel vorsichtig mit dem Daumen herausdrücken. Besondere Aufmerksamkeit muss der Unterstützung des Gelteils gewidmet werden, der die Starttaschen enthält, da das Gel leicht der Startlinie entlang bricht.

1. Markieren Sie die Färbeschalen mit Ihren Initialen und der Klasse. Sie färben zwei Gele in einer Schale.

2. **Färbung der Gele** (über Nacht)*
Lassen Sie die Gele vom Gelträger in die Färbeschale gleiten. Gießen Sie ca. 120 ml der 1x Färbelösung in die Färbeschale. Wenn nötig, geben Sie mehr Färbemittel hinzu, bis das Gel komplett bedeckt ist. Stellen Sie die Färbeschale auf einen Schüttler und bewegen das Gel über Nacht. Wenn kein Schüttler vorhanden ist, bewegen Sie das Gel einige Male zu Beginn der Färbung. Nach 2 Stunden sollte man die ersten Banden sehen. Wir empfehlen eine Färbung von 8 Stunden.



Färbung über Nacht

*Es ist äußerst wichtig, dass Sie die Gele während der Über-Nacht-Färbung mit dem 1x Fast Blast Farbstoff sanft und periodisch hin und her schwenken lassen, da kleinere Fragmente sonst dazu neigen zu diffundieren.

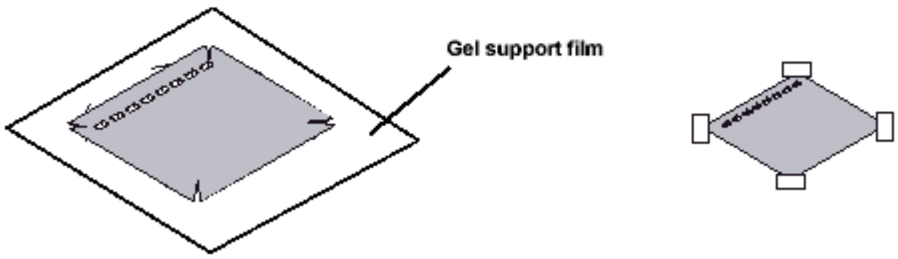
3. Aufzeichnen der Ergebnisse

Nach der Färbung mit 1x Fast Blast ist eine Entfärbung ist nicht notwendig. Die Gele können sofort nach der Färbung analysiert werden.

a. Legen Sie das Gel auf einen hellen Hintergrund und zeichnen Sie Ihre Ergebnisse in einem Diagramm wie folgt auf: Legen Sie ein durchsichtiges Blatt aus Kunststoff oder Acetat über das Gel. Mit einem Permanentmarker zeichnen Sie die Wells und Bandenmuster auf das Kunststoffblatt um eine Kopie Ihres Gels zu bekommen. Entfernen Sie das Kunststoffblatt für eine spätere Analyse. Alternativ können Gele auch auf einem gelben Stück (für einen optimalen Kontrast) eines transparenten Films fotokopiert werden.

b. Trocknen Sie das Agarosegel als einen dauerhaften Beleg Ihres Experimentes:

   i. Schneiden Sie alle leeren Bahnen des Gels mit einem Messer oder mit einer Rasierklinge ab. Schneiden Sie die unbenutzten Spuren in Ihrem Gel von oben bis unten ab, so dass nur die Spuren 1-4 übrig bleiben.
   ii. Legen Sie das Gel auf die **hydrophile** Seite des Gel Support Films. (Auf der hydrophoben Seite des Gel Support Films bilden sich Wassertropfen.) Legen Sie das Gel in die Mitte des Films und entfernen Sie Luftblasen, die sich zwischen Gel und Film gebildet haben. Legen Sie den Film auf ein Papiertuch und lassen Sie das Gel an einer gut belüfteten Stelle trocknen. Vermeiden Sie direkte Lichteinwirkung. Während des Trocknens bindet sich das Gel an den Film, schrumpft aber nicht. Der Trocknungsvorgang ist nach 2-3 Tagen bei Raumtemperatur abgeschlossen. Das Ergebnis ist ein transparenter und dauerhafter Beleg über das Experiment.



Zur Beachtung: Schützen Sie die getrockneten Gele vor direktem Licht, um ein Ausbleichen der Banden zu vermeiden. Die ausgeblichenen Banden erscheinen jedoch wieder, wenn man die getrockneten Gele 2-3 Wochen im Dunklen lagert.

4. Unterrichtsstunde: Analyse der Ergebnisse

Wenn Sie das Über-Nacht Protokoll zum Färben Ihrer Gele verwendet haben, zeichnen Sie Ihre Ergebnisse auf und trocknen sie die Gele wie es in den Gelfärbe-Anleitungen zur 3. Unterrichtsstunde auf Seite 42 beschrieben wurde.

Fügen Sie unten das Kunststoffblatt mit der Aufzeichnung Ihrer Bandenmuster von der DNA-Elektrophorese bei.

Aufzeichnung des Elektrophorese Gels

Fügen Sie unten das getrocknete Gel bei, das die Bandenmuster der DNA-Elektrophorese zeigt.

Getrocknetes Elektrophorese Gel

4. Stunde Analyse der DNA-Bandenmuster

Experimenteller Teil

Schülerarbeitsplätze	Anzahl	(✓)
Lineal mit Millimetereinteilung	1	❑
Zeichenpapier mit linearer Einteilung	1	❑
Zeichenpapier mit halblogarithmischer Einteilung	1	❑

Arbeitsplatz der Lehrkraft
Nicht erforderlich

Quantitative Analyse der DNA-Fragmente

Wenn Sie sich vor Gericht verantworten müßten, würden Sie einer Übereinstimmung aufgrund der groben Abschätzung eines Laboranten vertrauen, oder würden Sie auf einer genaueren Meßmethode bestehen?

Für einen genauen Vergleich zwischen der DNA vom Tatort und der DNA des Tatverdächtigen kann man sich nicht nur auf eine Übereinstimmung nach Augenmaß verlassen, sondern man muß die Fragmentgröße quantitativ (oder numerisch) bestimmen. Dies ist im Folgenden beschrieben:

1. Mit einem Lineal wird die Wanderungsstrecke jeder einzelnen Bande ausgemessen. Es wird die Strecke (in Millimetern) von der Unterkante der Starttasche bis zur Mitte der entsprechenden DNA-Bande gemessen und in die Tabelle auf der folgenden Seite eingetragen. Die Daten in der Tabelle werden benutzt, um eine Standardkurve zu erstellen und so die Größen der Restriktionsfragmente der DNA vom Tatort und der Tatverdächtigen abzuschätzen.

2. Zur genauen Abschätzung der Fragmentgröße der Tatort-DNA und der DNA der Tatverdächtigen, wird eine Standardkurve erstellt unter Verwendung der Abstands- (X-Achse) und Fragmentgrößendaten (Y-Achse) der Lambda/*Hind*III Größenmarker. Tragen Sie für die Banden 2-6 die Abstände in Abhängigkeit von der Größe sowohl auf Millimeterpapier als auch auf halblogarithmisches Papier auf. Verbinden Sie mit Hilfe eines Lineals auf allen Diagrammen die Datenpunkte mit einer Linie. Verlängern Sie die Linie bis zur rechten Seite des Diagramms.
   Welches Diagramm bietet die geradeste Linie, die Sie verwenden können, um die Fragmentgröße der DNA vom Tatort und der Tatverdächtigen abzuschätzen? Warum denken Sie, dass die eine graphische Darstellung gerader ist als das andere?

3. Entscheiden Sie, welches Diagramm, das lineare oder das halblogarithmische, zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen der Tatort-DNA und der Tatverdächtigen-DNA verwendet werden soll. Begründen Sie Ihre Wahl.

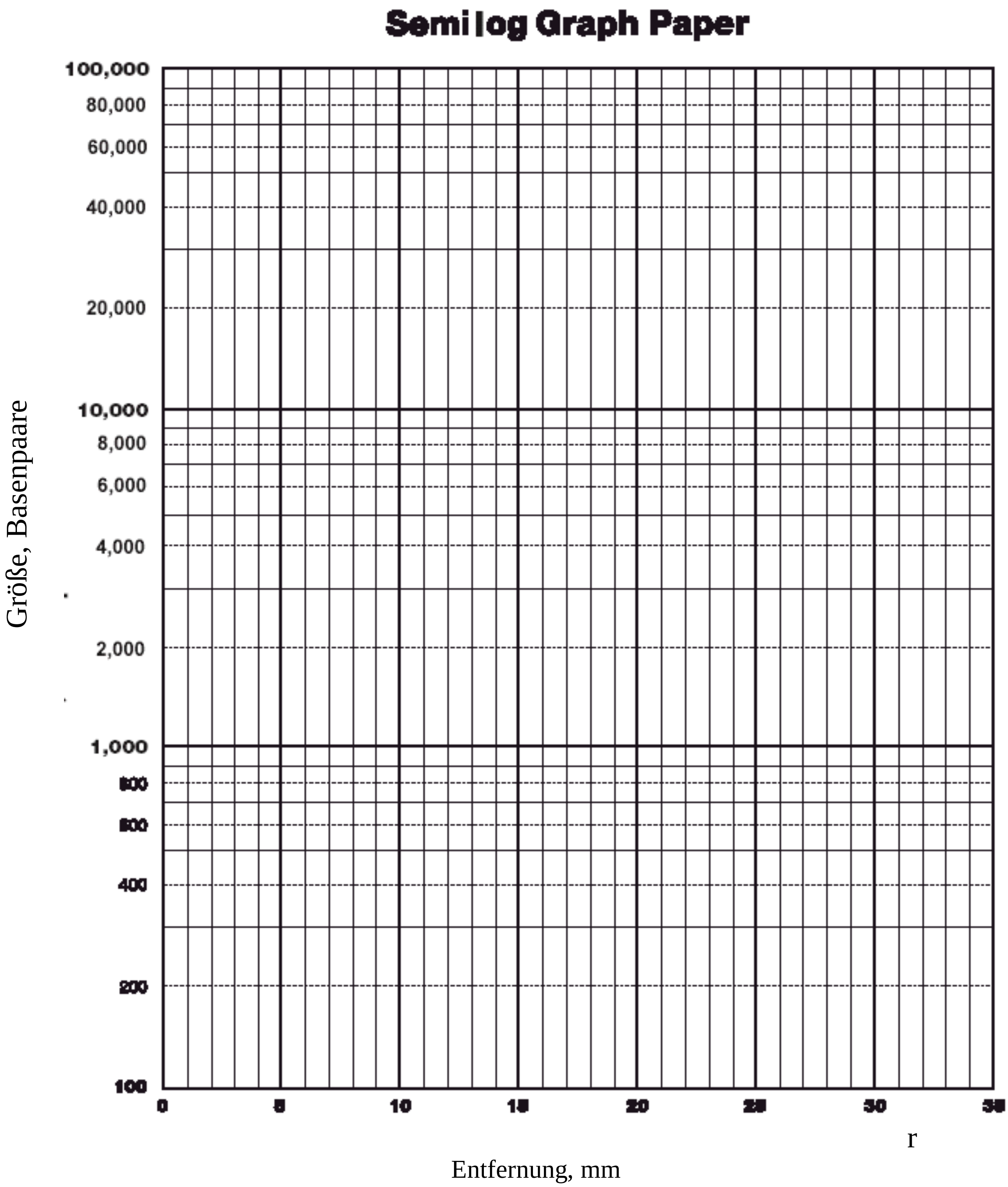
4. Zur Abschätzung der Größe eines unbekannten Tatort- oder Tatverdächtigen Fragments, bestimmen Sie die Wanderungsstrecke, die das Fragment zurückgelegt hat. Tragen Sie diesen Punkt auf der X-Achse der Standardkurve ein. Denken Sie sich von diesem Punkt auf der X-Achse eine Senkrechte bis zur Standardkurve und von da eine Waagrechte bis zur Y-Achse. Sie können die entsprechenden Hilfslinien auch mit dünnen Bleistiftstrichen einzeichnen, um sich das Vorgehen zu verdeutlichen. Dort, wo die Waagrechte die Y-Achse schneidet, kann die ungefähre Größe des unbekannten DNA-Fragments abgelesen werden. Verfahren Sie entsprechend für alle DNA-Fragmente vom Tatort und von den Verdächtigen.

5. Vergleichen Sie die Fragmentgrößen der DNA vom Tatort mit denen der Tatverdächtigen.
   Stimmen die Fragmentgrößen der DNA irgendeines Tatverdächtigen mit denen der DNA vom Tatort überein? Wie sicher sind Sie, daß hier eine Übereinstimmung vorliegt?

Elektrophorese-Daten: Messen Sie die Entfernung (in Millimetern), die jedes Fragment aus der Geltasche gelaufen ist und halten Sie dies in der Tabelle fest. Schätzen Sie seine Größe in Basenpaaren (Bp), in dem Sie seine Position mit den Lambda/HindIII Größenmarkern vergleichen. **Achtung: manche Spuren haben weniger als 6 Fragmente.**

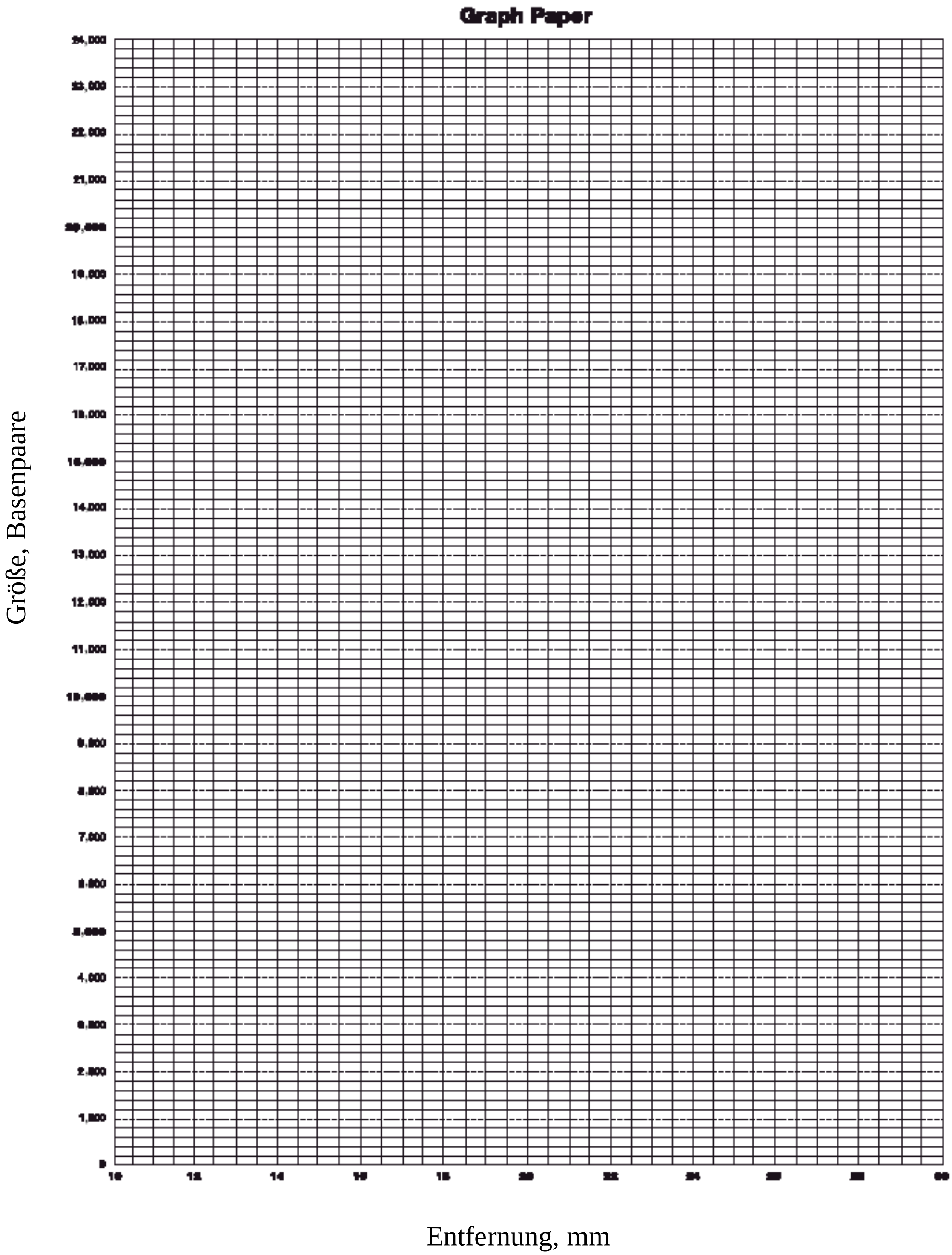
	Bande	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
	Abstand (mm)						
Lambda/Hind*III* Größenmarker	wirkliche Größe (Bp)	23,130	9,416	6,557	4,361	2,322	2,027
	Abstand (mm)						
Tatort	Größe ca. (Bp)						
	Abstand (mm)						
Verdächtiger 1	Größe ca. (Bp)						
	Abstand (mm)						
Verdächtiger 2	Größe ca. (Bp)						
	Abstand (mm)						
Verdächtiger 3	Größe ca. (Bp)						
	Abstand (mm)						
Verdächtiger 4	Größe ca. (Bp)						
	Abstand (mm)						
Verdächtiger 5	Größe ca. (Bp)						

DNA-Standard Laufstrecken der Banden:



Zur Abschätzung der Größe eines Fragments, das von der unbekannten DNA am Tatort oder der eines Tatverdächtigen stammt, muß zunächst die Wanderungsstrecke dieses spezifischen Fragments bestimmt werden. Tagen Sie diese Strecke auf der X-Achse der Standardkurve ein. Nehmen wir einmal an, die Bande Nr. 2 des Tatverdächtigen Nr. 5 sei 24 mm gewandert (A). Gehen Sie von der 24 mm Marke auf der X-Achse senkrecht nach oben zur Standardkurve und markieren Sie die Schnittstelle mit der Standardkurve durch einen schraffierten Kreis (B). Zeichnen Sie durch diese Schnittstelle eine Waagrechte bis zur Y-Achse, dieser Wert entspricht der ungefähren Größe des Fragments (C). Bande 2 des Tatverdächtigen 5 hat demnach ungefähr die Größe von 2000 Bp. Wiederholen Sie dieses Verfahren für alle Fragmente der DNA vom Tatort und der Tatverdächtigen. Tragen Sie die ungefähren Fragmentgrößen in die Datentabelle ein.

Fingerprinting Standard Kurve: Linear



Interpretation der Ergebnisse

1. Was soll hier bestimmt werden? Formulieren Sie noch einmal unsere zentrale Frage.

2. Welche der DNA-Proben sind fragmentiert worden? Wie würde das Gel aussehen, wenn keine Fragmentierung stattgefunden hätte?

3. Wodurch wurde die DNA fragmentiert?

4. Wovon hängt es ab, an welcher Stelle eine Restriktionsendonuklease ein DNA-Molekül schneidet?

5. Eine Restriktionsendonuklease „schneidet“ zwei DNA-Moleküle an der gleichen Stelle. Was haben diese beiden Moleküle **an dieser Stelle** demnach gemeinsam?

6. Sieht es so aus, als hätte die DNA von irgendeinem Tatverdächtigen *Eco*RI oder *Pst*I Erkennungsstellen an derselben Stelle auf dem Molekül wie die DNA vom Tatort?

7. Sieht es aufgrund der obigen Analyse so aus, als stamme die DNA von einem der Tatverdächtigen und die vom Tatort vom gleichen Individuum? Beschreiben Sie die wissenschaftliche Grundlage, auf die sich Ihre Schlußfolgerung stützt.

Anhang A

Alternative DNA-Fingerprinting Szenarien

DNA-Typing, DNA-Profiling und DNA-Fingerprinting sind alles Namen für ein und dasselbe Verfahren, nämlich ein Verfahren, bei dem DNA verwendet wird, um eine Verwandtschaft oder Identität von menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Individuen aufzuzeigen. DNA-Typing ist zu einem viel diskutierten Thema geworden und hat großes Interesse geweckt, weil in gerichtsmedizinischen Analysen in prominenten Strafprozessen, wie dem Fall von O.-J. Simpson davon Gebrauch gemacht worden ist. DNA-Typing findet jedoch eine viel breitere Anwendung als nur in der Gerichtsmedizin und hat einen tiefgreifenden Einfluß auf unsere Gesellschaft.

DNA-Typing wird in der Gerichtsmedizin, Anthropologie und in der Biologie im Bereich Naturschutz nicht nur dazu benutzt, die Identität eines Individuums zu bestimmen, sondern auch, um Verwandtschaftsbeziehungen nachzuweisen. Diese Methode hat dabei geholfen, unschuldige Tatverdächtige wieder auf freien Fuß zu setzen, Kinder mit ihren Verwandten zusammenzuführen, gestohlene Tiere zu identifizieren und nachzuweisen, daß anstelle von Fisch Walfleisch zu Sushi verarbeitet wurde. Sie wird in Kriegszeiten dazu benutzt, sterbliche Überreste von Gefallenen zu identifizieren. Sie wird weiterhin dazu verwendet, genetische Merkmalskopplungen für vererbliche Krankheiten zu finden. Darüber hinaus lernen Wissenschaftler mit Hilfe der DNA-Analyse eine Menge über die Entwicklungsgeschichte des Menschen.

Jeder der folgenden Abschnitte beschreibt ein Szenarium, bei dem aufgrund einer DNA-Analyse gezeigt werden konnte, daß Individuen miteinander verwandt sind, oder daß eine Person eine Straftat begangen bzw. nicht begangen hat. Diese Szenarien liefern einen Kontext für die Erläuterung des DNA-Typing in den Fächern Molekularbiologie, Naturschutz Biologie und Biotechnologie. Lassen Sie die Schüler sich ein Gebiet aussuchen, das sie interessiert und anschließend ihre Ergebnisse der Klasse vortragen.

1. **Identifizierung von Nahrungsmitteln (Identifizierung gefährdeter Arten**)
   Die Reinheit (oder Unreinheit) von Rinderhack ist mit Hilfe von DNA-Typing nachgewiesen worden. Bei Hamburgern wurde gezeigt, daß sie oft eine Mischung aus Schweinehack und anderen Fleischarten enthalten. Mit Hilfe von DNA-Typing und tragbaren Analysegeräten konnten Aufsichtsbeamte nachweisen, daß als Sushi angebotener Fisch in Wirklichkeit Wal- oder Delphinfleisch war. Oft handelt es sich hier um gefährdete Arten, die durch internationale Gesetze geschützt sind.

2. **Angeklagte und verurteilte Verbrecher werden aufgrund von DNA-Typing auf freien Fuß gesetzt**.
   Ein Mann, der seit 10 Jahren im Gefängnis saß, wurde entlassen, nachdem mit Hilfe von DNA-Analysen, die zum Zeitpunkt der Verurteilung noch nicht zur Verfügung standen, bewiesen werden konnte, daß er die Vergewaltigung nicht begangen haben konnte. Statistiken zeigen, daß etwa ein Drittel aller mutmaßlicher Sittlichkeitsverbrecher aufgrund der DNA-Analyse freigesprochen werden.

3. **Identifizierung sterblicher Überreste**
   Wissenschaftler konnten mit Hilfe von DNA-Typing bestätigen, daß ein Körper im Grab die Person war (oder auch nicht), die dort begraben sein sollte. In Russland wurden Knochen gefunden, von denen angenommen wurde, daß sie von den Romanovs, Rußlands letzter königlichen Familie, stammten. Zar Nikolaus II. und seine Familie wurden von den Bolschewisten 1918 hingerichtet. Experten aus der ganzen Welt studierten die Knochen, um Schädel, Zähne und andere Merkmale mit Fotografien in Einklang zu bringen. DNA aus den Knochen wird mit der von bekannten Nachkommen der Familie verglichen, um zu bestimmen, ob die Knochen in der Tat vom Zaren und seiner Familie stammen.

4. **Bestimmung des Verwandtschaftsgrades zwischen Menschen**.
Durch DNA-Typing konnte nachgewiesen werden, daß ein 5000 Jahre alter „Eismann“, der in einem schmelzenden Gletscher gefunden wurde, mit modernen Europäern eng verwandt ist. („Iceman Gets Real“, Science, Bd. 264, S. 1669, 17. Juni 1994). Die durch das DNA-Typing erhaltenen Daten „machen auch Schluß mit allen Gerüchten, daß der Körper ein Schwindel ist – d.h., daß er dort auf das Eis gelegt wurde“, so Svante Paabo von der Universität München (Science. Bd. 264, S. 1775, 17. Juni 1994).

5. **Untersuchung des Verwandtschaftsgrades zwischen alten Kulturen**.
Bei archäologischen Ausgrabungen im westlichen Montana gefundene DNA wird dazu benutzt, festzustellen, wie viele verwandte Menschengruppen (Familien) an einer bestimmten Stelle gelebt haben. (Morell Virginia. „Pulling Hair from the Ground“. Science, Bd. 265, S. 741-745, August 1994).

6. **DNA-Untersuchungen der Familienzugehörigkeit.**
DNA-Untersuchungen der Familienzugehörigkeit sind in Argentinien und El Salvador dazu herangezogen worden, die Kinder von mindestens 9000 Bürgern dieser Länder, die zwischen 1975 und 1983 verschwunden, d.h. von Spezialeinheiten des herrschenden Militärs und der Polizei entführt wurden, zu identifizieren. Viele leibliche Kinder dieser verschwundenen Erwachsenen wurden gekidnappt und von militärischen „Eltern“ adoptiert, die vorgaben ihre leiblichen Eltern zu sein. Nachdem durch genetische Untersuchungen der Großfamilie die wahre Identität eines Kindes festgestellt wurde, konnte es zu seinen biologischen Verwandten gebracht werden. Es wurde zunächst befürchtet, daß der Transfer eines Kindes von seinen militärischen „Eltern“, die zwar Kidnapper waren, aber das Kind jahrelang aufgezogen hatten, traumatisch sein könnte. In der Praxis wurden die Kinder mit geringem Trauma in ihre biologischen Familien integriert.

7. **Identifizierung von Krankheiten verursachenden Organismen**.
Eva Harris, eine Wissenschaftlerin der Universität von Kalifornien in San Francisco, hilft Wissenschaftlern in Nicaragua und Ecuador die DNA-Methoden zu erlernen, um damit Tuberkulose entdecken, sowie das Dengue Virus und verschiedene Leishmania Stämme identifizieren zu können. Auf die Ergebnisse derzeit angewandter Methoden, bei denen die Krankheitserreger kultiviert und dann zur Identifizierung an ausländische Labors geschickt werden, muß wochenlang gewartet werden. (Marcia Barinaga. „A Personal Technology Transfer Effort in DNA Diagnostics“ Science 266, S. 1317-1318, 25. November 1994).

8. **Identifizierung der biologischen Eltern (Vaterschaftsbestimmungen**)
Als in Florida ein Mädchen an einer Erbkrankheit starb, stellte es sich heraus, daß es mit einem anderen Mädchen bei der Geburt vertauscht worden war. Die Krankheit kam in ihrer Familie nicht vor, aber es war bekannt, daß sie bei der Familie eines anderen Mädchens, das im selben Krankenhaus zu etwa derselben Zeit geboren worden war, auftrat.

9. **Vaterschaftstest**
Eine Frau die am 7. Januar 1943, ihrem 18. Geburtstag, von ihrem Arbeitgeber vergewaltigt worden war, wurde daraufhin schwanger. Das Kind wußte, wer sein Vater war, aber dieser bestritt die Vaterschaft, solange er lebte. Nach dem Tod des Mannes, wurde mittels DNA-Analyse nachgewiesen, daß sie seine Tochter war und so erbte sie die Hälfte seines Nachlasses. („A Child of Rape Wins Award from Estate of Her Father“. New York Times, 10. Juli 1994).

10. **Bestimmung des Erfolgs einer Knochenmarktransplantation.**
„DNA-Fingerprinting kann Ärzten helfen, Knochenmarktransplantationen zu überwachen. Leukämie ist ein Knochenmarkkrebs und das kranke Mark muß deshalb entfernt werden. Das Knochenmark ist aber für die Herstellung neuer Blutzellen notwendig. Ohne eine Transplantation von gesundem Knochenmark müßte ein Leukämiekranker also sterben. Durch DNA-Typisierung von Patient und Spender können Ärzte schnell erkennen, ob eine Transplantation erfolgreich war. Im Erfolgsfall weist ein DNA-Fingerprint vom Blut des Patienten das DNA-Muster des Spenders auf. Wurde aber das krebsbefallene Knochenmark nicht vollständig zerstört, so werden sich die

Krebszellen schnell vermehren und die DNA-Banden des Patienten werden überwiegen“. („Our Ultimate Identity Card in Sickness and in Health.“ In „Inside Science“, New Scientist, 16. Nov. 1991).

11. **Nachweis der Verwandtschaft zwischen Einwanderern**.
DNA-Fingerprinting ist auch als Vaterschaftsnachweis zu Einwanderungszwecken verwendet worden. 1986 erhielt das Britische Innenministerium 12000 Einwanderungsanträge von Witwen und Kindern von Männern aus Bangladesch und Pakistan, die im Vereinigten Königreich lebten. Die Beweislast fällt dem Antragsteller zu, wobei der Nachweis der Familienzugehörigkeit auf Grund lückenhafter Dokumente schwierig sein kann. Bluttests sind mitunter ohne Beweiskraft, aber Ergebnisse des DNA-Fingerprintings werden als Vaterschaftsnachweis vom Innenministerium akzeptiert. (DNA fingerprints, source unknown. Based on A.J. Jeffreys *et al*., „Positive Identification of an Immigration Test-Case Using Human DNA Fingerprints.“ Nature, 317:818-819, 1985).

12. **Bestätigung der Verwandtschaft zwischen Tieren.**
Wissenschaftler, die DNA aus Haaren von Schimpansen aus verschiedenen Teilen Afrikas extrahiert haben, erhielten so Hinweise, daß möglicherweise eine dritte Art von Schimpansen existiert. Gleichzeitig haben sie Einsicht in das Verhalten von Schimpansen und deren Familienbeziehungen gewonnen, die zu theoretisieren früher Jahre gedauert hätte. Sie entdeckten, daß eine in Westafrika lebende Schimpansengruppe sich genetisch von den in anderen Teilen Afrikas lebenden Schimpansen unterscheidet, was vermuten läßt, daß es sich hierbei um eine gefährdete Art handeln könnte. Die Wissenschaftler entdeckten, daß die in einem vorgegebenen Bereich lebenden männlichen Schimpansen oft so nahe verwandt sind wie Halbbrüder und daß viele sogenannte Unterarten in Wirklichkeit zu einer einzigen Art gehören. Der hohe Verwandtschaftsgrad der männlichen Schimpansen kann vielleicht erklären, warum sich, anders als bei Primaten, die männlichen Schimpansen durchaus freundlich gesonnen sind.

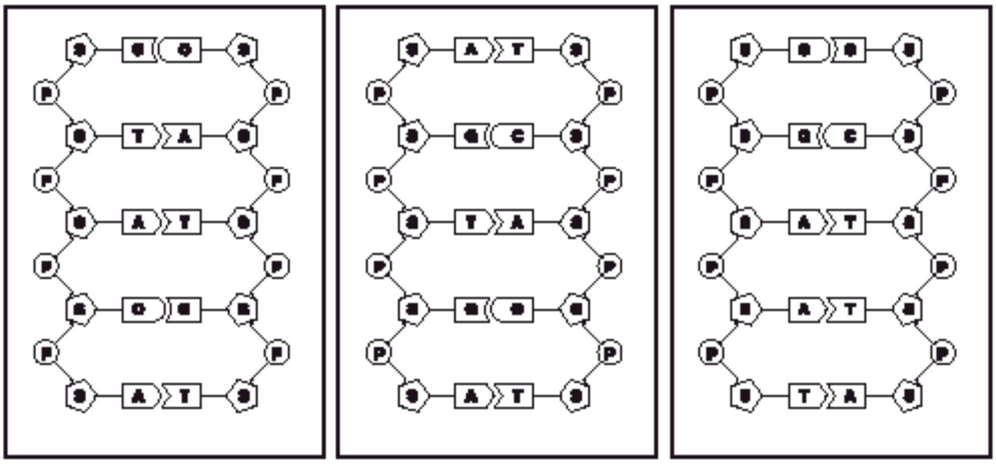
13. **DNA-Analyse von Pflanzenmaterial weist nach, daß ein Tatverdächtiger am Tatort war.**
Zwei kleine Samenschoten auf der Ladefläche eines Kleinlastwagens, bewiesen, daß ein des Mordes Angeklagter am Tatort war. Genetische Tests ergaben, daß die DNA der Samenschote identisch war mit der DNA einer am Tatort gefundenen Pflanze. Der Angeklagte hatte bisher zwar zugegeben, dem Opfer eine Mitfahrgelegenheit geboten zu haben, aber abgestritten, jemals in der Nähe des Tatorts gewesen zu sein.

Anhang B

Vorbereitung auf die 1. Laborstunde: Ein Überblick über Restriktionsenzyme

DNA besteht aus einer Serie von stickstoffhaltigen Molekülen, die durch schwache Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden. Diese Basenpaare wiederum sind an ein Rückgrat aus Zucker und Phosphat gebunden. Es gibt vier verschiedene Nukleobasen: **Adenin**, **Thymin**, **Guanin** und **Cytosin** (**A**, **T**, **G** und **C**; erinnern Sie sich an die Regel für die Basenpaarung A-T und G-C). Abbildung 1 zeigt die Struktur eines DNA-Moleküls.

Abb. 1. Die Struktur der DNA



DNA Molekül I Pflanze | DNA Molekül II Mensch | DNA Molekül III Bakterium

Wird ein Segment der DNA ohne Zucker und Phosphat angegeben, so erscheint die Basenpaarsequenz wie folgt:

Von links nach rechts zu lesen

--→ A C T C C G T A G A A T T C -→
<--- T G A G G C A T C T T A A G <---

Von rechts nach links zu lesen

Betrachten Sie die linearen Basensequenzen (As, Ts usw.) auf beiden Strängen:

- Beschreiben Sie alle Muster, die Sie in der oberen Basensequenz erkennen.

- Vergleichen Sie die Basen im oberen Teil des Moleküls mit denen im unteren Teil. Beschreiben Sie alle Beziehungen, die Sie erkennen können.

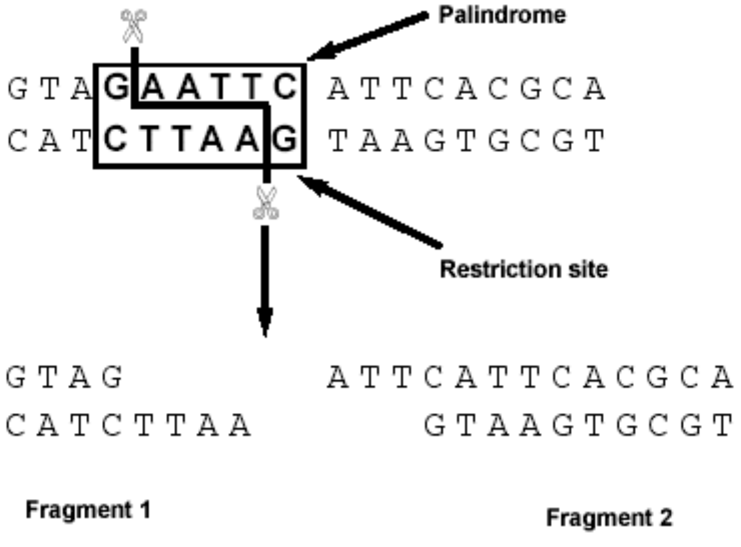
- Betrachten Sie die obere Basensequenz und vergleichen Sie sie mit der unteren. Erkennen Sie eine Gruppierung von Basen, bei der beim Lesen nach rechts bzw. nach links die Basen in derselben Reihenfolge erscheinen?

Sie haben vielleicht erkannt, daß die Basensequenz willkürlich angeordnet ist und daß sich beide Stränge anscheinend komplementieren; die **A**s sind mit den **T**s gepaart usw. Sie haben vielleicht auch erkannt, daß ein Teil des oberen Stranges **GAATTC** (von links nach rechts gelesen) ein Gegenstück im unteren Strang hat: **CTTAAG** (von rechts nach links gelesen). Ähnliche Sequenzen sind **AAGCTT** und **TTCGAA** sowie **CTGCAG** und **GACGTC**. Wenn eine solche Sequenz zusammen mit ihrer komplementären Sequenz angesehen wird, liest sich die Gruppe in beiden Richtungen gleich. Diese Sequenzen, **Palindrome** genannt, kommen in einem DNA-Molekül recht häufig vor.

Restriktionsenzyme – Molekulare Scheren

Ein Haupt-„Feind“ von Bakterien sind Viren, sogenannte Bakteriophagen, wie z.B. Lambda. Diese Viren infizieren Bakterien, indem sie ihre eigene DNA in die Bakterien injizieren und so versuchen, die Kontrolle über die Bakterienzelle zu übernehmen. Die Bakterien haben darauf mit der Entwicklung eines natürlichen Verteidigungssystems (den sogenannten Restriktionsenzymen) reagiert, um so die eindringende DNA zu zerschneiden und zerstören zu können. Die Bakterien verhindern den Verdau ihrer eigenen DNA, indem sie bestimmte DNA-Basen innerhalb der bestimmten Enzymerkennungssequenz modifizieren. So können sie ihre eigene DNA schützen während sie die Fremd-DNA zerschneiden. Dies kann als ein sehr primitives Immunsystem betrachtet werden. Diese Enzyme suchen die virale DNA nach bestimmten Palindromen ab (z.B. **GAATTC**) und schneiden die DNA an solchen Stellen in Stücke. Die genaue Stelle in einem Palindrom an der die DNA geschnitten wird, wird **Restriktionsschnittstelle** genannt. Einige Restriktionsenzyme hinterlassen an der Schnittstelle kurze Stücke von ungepaarten Nukleotidbasen, sogenannte „sticky ends“. Andere Restriktionsenzyme schneiden glatt über beide Stränge und hinterlassen stumpfe Enden an den doppelsträngigen DNA-Fragmenten.

Betrachten Sie folgende DNA-Sequenz:



Ein Restriktionsenzym hat die DNA in einem **GAATTC** Palindrom zwischen dem **G** und dem **A** geschnitten.

- Wie viele Basenpaare befinden sich links vom „Schnitt“?

- Wie viele Basenpaare befinden sich rechts vom „Schnitt“?

- Zählt man die Anzahl der Basenpaare; ist dann das rechte Fragment genauso groß wie das linke?

- Wie können Sie die Fragmentgröße in Bezug auf die Anzahl der im Fragment enthaltenen Basenpaare beschreiben?

Eine wichtige Tatsache, die man von Restriktionsenzymen wissen muß ist, daß jedes Enzym nur ein spezifisches Palindrom erkennt und die DNA nur an dieser spezifischen Basensequenz spaltet. Ein Palindrom kann auf einem DNA-Strang mehrere Male vorkommen und die spezifischen Restriktionsenzyme **schneiden alle diese Palindrome** an ihrer Restriktionsstelle, egal aus welcher Art die DNA stammt.

- Das **GAATTC** Palindrom wird viermal auf demselben Stück linearer DNA wiederholt und das Restriktionsenzym, das diese Basenpaare erkennt, ist vorhanden und verdaut die DNA. Wieviele DNA-Fragmente werden entstehen?

- Das **GAATTC** Palindrom wird in willkürlichen Abständen entlang des DNA-Stranges wiederholt. Welche Aussage können Sie dann über die Größe der entstehenden Fragmente machen, die durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym entstehen, das diese Sequenz erkennt?

Die folgende Tabelle zeigt zwei Arten von Palindromen, die in einem DNA Strang vorkommen können, zusammen mit dem spezifischen Enzym, das diese Sequenz erkennt.

Palindromsequenz auf dem DNA-Molekül	**Name des Enzyms, das dieses Palindrom erkennt**
GAATTC CTTAAG	*Eco*RI
AAGCTT TTCGAA	*Hind*III
CTGCAG GACGTC	*Pst*I

Fassen wir zusammen, was wir bisher gelernt haben

- **Die Basensequenz auf einem Strang der DNA kann ein Palindrom auf dem anderen Strang haben, z.B.:**

  GAATTC
  CTTAAG

- **Palindrome werden von Restriktionsenzymen erkannt.**

- **Restriktionsenzyme schneiden die Palindrome an den Restriktionsstellen.**

- **Ein Restriktionsenzym erkennt nur eine bestimmte Art von Palindrom.**

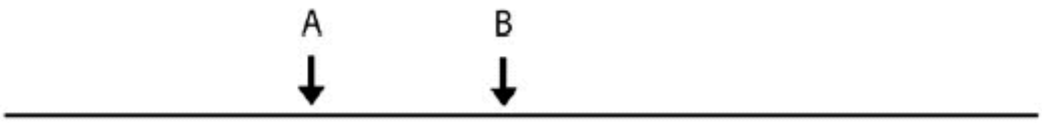
- **Durch das Schneiden der DNA an Restriktionsstellen entstehen DNA-Fragmente.**

- **Die Größe der Fragmente kann durch die Anzahl der in ihnen enthaltenen Basenpaare beschrieben werden.**

Wenden Sie das bisher Gelernte an.

Eine lineares DNA-Molekül wird unten als durchgezogene Linie dargestellt, obwohl die DNA in Wirklichkeit aus zwei Strängen besteht.

- Wenn ein DNA-Molekül die Restriktionsstellen A und B für ein bestimmtes Restriktionsenzym besitzt, wie viele Fragmente werden entstehen, wenn die DNA von diesem Enzym geschnitten wird?



- Numerieren Sie jedes Fragment.

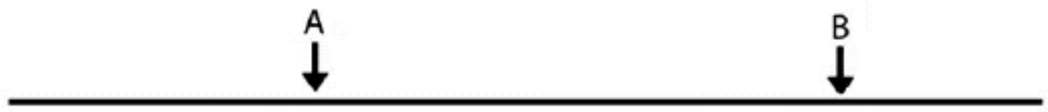
- Welches Fragment wäre das größte sein?

- Welches Fragment wäre das kleinste?

∞ Zeichnen Sie ein DNA-Molekül, das für ein spezifisches Palindrom in willkürlichen Abständen 5 Restriktionsstellen besitzt. Wie viele Fragmente würden entstehen, wenn jede Restriktionsstelle von einem Restriktionsenzym gespalten wird?

∞ Numerieren Sie alle Fragmente.

∞ Listen Sie sie der Größe nach auf. (Das größte Fragment zuerst).



In diesem Diagramm stehen A und B für unterschiedliche Palindromsequenzen auf einem DNA-Strang. Es ist nur das Restriktionsenzym vorhanden, das die Restriktionsstelle B erkennt.

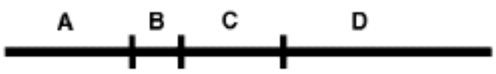
∞ Erklären Sie, warum nur zwei Fragmente entstehen würden.

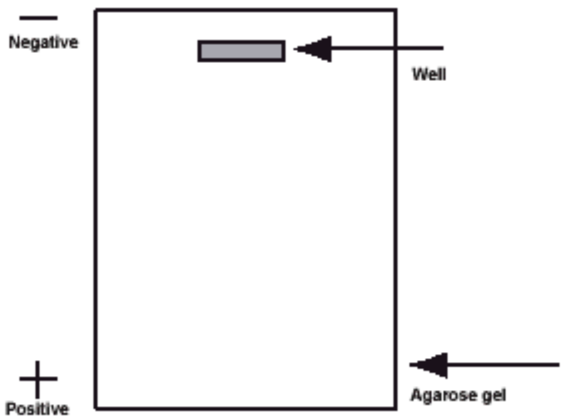
Vorbereitung auf die 2. Laborstunde: Überblick über die Elektrophorese

Wie kann man DNA-Fragmente sichtbar machen?

Bei der Agarose Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die DNA ist eine Säure und hat **viele negative elektrische Ladungen**. Wissenschaftler haben dies ausgenutzt, um eine Methode zu entwickeln, mit der DNA-Fragmente getrennt werden können. Eine Lösung, die eine Mischung von DNA-Fragmenten enthält, wird in eine kleine Starttasche pipettiert, die aus dem Gel ausgespart wurde. (Das Gel erinnert an Wackelpudding). Die Moleküle werden durch Anlegen einer elektrischen Spannung in Bewegung gesetzt. Entgegengesetzte elektrische Ladungen ziehen sich gegenseitig an; **negative (-) Ladungen wandern zur positiven (+) Ladung**. Stellen Sie sich das Gel als Sieb mit kleinen Poren vor, durch das kleine Partikel sehr schnell hindurchgehen können. Je größer allerdings die Partikel sind, desto langsamer werden sie durch das Gel „gesiebt“. Nachdem die Moleküle eine Weile dem elektrischen Feld ausgesetzt waren, trennen sich die Fragmente der Größe nach auf. **Fragmente gleicher Größe haben die Tendenz, zusammen durch das Gel zu wandern**. Eine solche Gruppe von gleich großen Molekülen bildet Zonen mit erhöhter Konzentration, die auch **Banden** genannt werden.

Ein lineares Stück DNA wird, wie unten gezeigt in 4 Fragmente geschnitten. Eine Lösung mit den 4 Fragmenten wird in eine Starttasche eines Agarosegels pipettiert. Zeichen Sie auf der rechten Seite ein, was Sie aufgrund der obigen Informationen bezüglich der Auftrennung der Fragmente erwarten. Markieren Sie jedes Fragment mit dem ihm zugehörigen Buchstaben.





- ∞ Lassen Sie die Lehrkraft das Diagramm überprüfen, bevor Sie fortfahren.

- ∞ Wo würden sich die größeren Fragmente – die mit der größeren Anzahl an Basenpaaren - befinden: mehr im oberen, oder mehr im unteren Teil des Gels? Warum?

- ∞ Angenommen, Sie hätten von allen vier Fragmenten je 500 Stück, wie würde in diesem Fall das Gel aussehen?

- ∞ Wenn es möglich wäre, jedes Fragment zu wiegen, welches Fragment wäre das schwerste? Warum?

- ∞ Vervollständigen Sie diese Regel zur Wanderung der DNA-Fragmente durch ein Agarosegel:

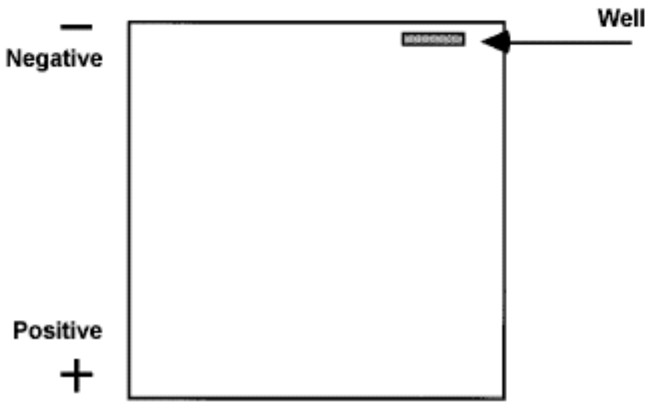
  Je größer die DNA-Fragmente, desto...

Dieses Diagramm stellt ein Stück DNA dar, das mit *Hind*III an allen durch die Pfeile gekennzeichneten Restriktionsstellen geschnitten wird. Die Zahlen geben die Anzahl der in jedem Fragment vorhandenen Basenpaare an.



∞ Wieviele Fragmente werden durch das Restriktionsenzym *Hind*III produziert?

∞ Zeichnen Sie in dem unten abgebildeten Gel die Fragmente an den Stellen ein, an denen sie sich Ihrer Meinung nach am Schluß der Elektrophorese befinden.



∞ Beschriften Sie jedes Fragment mit seiner korrekten Anzahl an Basenpaaren.

Anhang C
Antwort Teil für die Lehrkraft

1. Stunde: Einführung zum DNA-Fingerprinting.

1. Vergleichen Sie das „Rückgrat“ aus Zucker- und Phosphatbausteinen in allen drei oben abgebildeten Seitenketten. Gibt es irgendwelche Unterschiede?

   Die Anordnung ist in allen drei Beispielen identisch.

2. Enthalten alle drei Proben der obigen Abbildung dieselben Basen? Beschreiben Sie Ihre Beobachtungen.

   Alle drei Beispiele enthalten die selben Nukleobasen: Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin.

3. Sind die Basen in allen drei Proben in gleicher Weise gepaart? Beschreiben Sie das Muster der Basenpaarung.

   Adenin ist immer an Thymin gebunden und Cytosin immer an Guanin.

4. Welche Annahmen können Sie bei Ihrem Versuch, die DNA-Proben von drei verschiedenen Individuen zu analysieren, über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der DNA-Proben machen?

   Die Anordnung der Zuckerphosphate ist für alle drei Beispiele gleich; dasselbe gilt für die Art der Basen. Der einzige Unterschied zwischen den drei Beispielen liegt in der Anordnung der Basen.

5. Was genau muß zwischen diesen Proben verglichen werden, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sie identisch sind oder nicht?

   Die Basensequenzen in den individuellen Proben.

2. Stunde: Verdau der DNA-Probe mit Restriktionsenzymen

1. Wie viele DNA-Stücke würden bei diesem Schnitt entstehen? **2**

2. Schreiben Sie die Basensequenz sowohl des rechten als auch des linken DNA-Fragments auf.

   ATG **AATTCTCAATTACCT**
   TACTTAA **GAGTTAATGGA**

3. Welche Unterschiede bestehen zwischen diesen beiden Fragmenten?

   Die Fragmente sind verschieden groß.

4. Die Größe eines DNA-Fragments kann durch die Anzahl der Basenpaare in diesem Fragment ausgedrückt werden. Geben Sie die Größe der Fragmente an. (Notieren Sie alle Abweichungen, die Sie entdecken können.)

   Ein Fragment ist kurz, das andere lang; weiterhin sind einige Basen ungepaart.

   a) Das kleinere Fragment besteht aus **3** Basenpaaren.
   b) Wie lang ist das längere Fragment? **11**

5. Betrachten Sie die beiden unten gezeigten DNA-Proben (der Einfachheit halber sind nur Einzelstränge abgebildet):

   Probe Nr.1
   C A G T G A T C T C G A A T T C G C T A G T A A C G T T

   Probe Nr. 2
   T C A T G A A T T C C T G G A A T C A G C A A A T G C A

   Geben Sie für den Fall, daß beide Sequenzen mit einem Restriktionsenzym mit der Erkennungssequenz GAATTC behandelt würden, die Anzahl und Größe der sich ergebenden Fragmente an.

   Probe Nr.1
   Anzahl der Fragmente: **2**

   Probe Nr. 2
   Anzahl der Fragmente: **2**

   Listen Sie die Fragmente der Größe nach auf (das größte zuerst):

   Probe Nr.1
   17 Bp Fragment
   11 Bp Fragment

   Probe Nr. 2
   23 Bp Fragment
   5 Bp Fragment

2. Stunde: Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen

Beobachtungsfragen:

1. Beschreiben Sie die physikalische Eigenschaften der DNA-Proben.

   Die DNA-Proben bestehen aus einer durchsichtigen, farblosen Flüssigkeit.

2. Können Sie irgendwelche Unterschiede zwischen den Proben feststellen?

   Nein, alle Proben sehen gleich aus.

3. Beschreiben Sie das Aussehen der Restriktionsendonukleasemischung.

   Die Restriktionsenzyme erscheinen als durchsichtige, farblose Flüssigkeiten.

2. Stunde: Verdau der DNA-Proben mit Restriktionsenzymen

Abschlußfragen

1. Beschreiben Sie alle sichtbaren Veränderungen des Inhalts der DNA-Proben, nachdem diese mit den Reaktionsenzymen versetzt, aber noch nicht inkubiert worden sind.

   DNA und *Eco*R1/*Pst*I Enzymmischung:
   In den Reaktionsgefäßen ist keine Änderung zu erkennen.

2. Können Sie irgendwelche Anzeichen dafür erkennen, daß die DNA-Proben durch die Zugabe von *Eco*RI/*Pst*I fragmentiert oder sonstwie verändert wurden? Erklären Sie dies.

   Nein, in den Reaktionsgefäßen ist keine Änderung zu erkennen.

3. Ist es möglich, daß die DNA-Proben fragmentiert wurden, obwohl es keine erkennbaren Anzeichen dafür gibt? Begründen Sie Ihre Antwort.

   Ja. Die DNA-Proben sind möglicherweise chemisch verändert, aber die Änderungen sind nicht erkennbar. Die Enzyme haben möglicherweise die DNA hydrolysiert.

4. (Am nächsten Tag zu beantworten) Gibt es nach der 24-stündigen Inkubation irgendwelche Anzeichen dafür daß die Restriktionsenzyme die DNA in einem der Reaktionsgefäße verändert haben könnten? Begründen Sie Ihre Antwort.

   Nein, es sind keine Veränderungen in den Reaktionsgefäßen zu erkennen, aber die Enzyme haben möglicherweise die DNA hydrolysiert. Die Reaktionen spielen sich auf molekularer Ebene ab, deren Dimensionen zu gering sind, um mit bloßem Auge erkannt zu werden.

3. Stunde: Elektrophorese der DNA-Proben

Abschlußfragen

1. Das Elektrophoresegerät erzeugt ein elektrisches Feld mit positiven und negativen Polen an den Enden des Gels. DNA-Moleküle sind negativ geladen. Zu welchem Pol des elektrischen Feldes wird die DNA Ihrer Meinung nach wandern (+ oder -)? Erklären Sie Ihre Antwort.

   Positiv

2. Welche Farbe steht für den negativen Pol?

   Schwarz

3. Nachdem die DNA-Proben in die Starttaschen geladen wurden, werden sie „gezwungen“ durch die Gelmatrix zu wandern. Welche Fragmente wandern am schnellsten zum anderen Ende des Gels (große oder kleine)? Begründen Sie Ihre Antwort.

   Die kleineren Fragmente. Diese erfahren bei ihrer Wanderung durch die Gelmatrix den geringeren Widerstand.

4. Welche Fragmente wandern die kürzeste Strecke – von den Geltaschen aus gesehen? Begründen Sie Ihre Meinung.

   Die größeren Fragmente. Diese erfahren bei ihrer Wanderung durch die Gelmatrix den größeren Widerstand.

4. Stunde: Verständnisfragen

1. Was ist höchstwahrscheinlich in jeder Bande enthalten?

   DNA-Fragmente.

2. Angenommen dies wäre ein Fingerprinting Gel, wie viele DNA-Proben erwarten Sie in jeder separaten Bahn?

   Eine.

3. Was wäre eine logische Erklärung dafür, daß für alle DNA-Proben mehr als eine Bande zu sehen ist?

   Die DNA ist wahrscheinlich durch Restriktionsenzyme fragmentiert worden.

4. Wodurch entstanden die DNA-Fragmente?

   Die chemische Reaktion von Restriktionsenzymen, die die DNA an spezifischen Basensequenzen geschnitten hat.

5. Welche DNA-Proben hatten für die verwendeten Restriktionsendonukleasen die gleiche Anzahl an Schnittstellen? Schreiben Sie die Nummern der entsprechenden Bahnen auf.

   Die Bahnen 2, 3 und 4 (TO, V1 und V2).

6. Welche Probe weist das kleinste DNA-Fragment auf?

   Die Probe in Bahn 5 (V3).

7. Geht man von einer ringförmigen DNA aus (Plasmid), die als Startmaterial eingesetzt wurde, wie viele Restriktionsschnittstellen hatte dann Bahn 3?

   Zwei Restriktionsschnittstellen, aufgrund deren die Proben in zwei Fragmente geschnitten wurden.

8. Welche DNA-Proben wurden anscheinend in Fragmente von gleicher Anzahl und Größe geschnitten?

   DNA der Bahnen 2 und 4 (TO und V2).

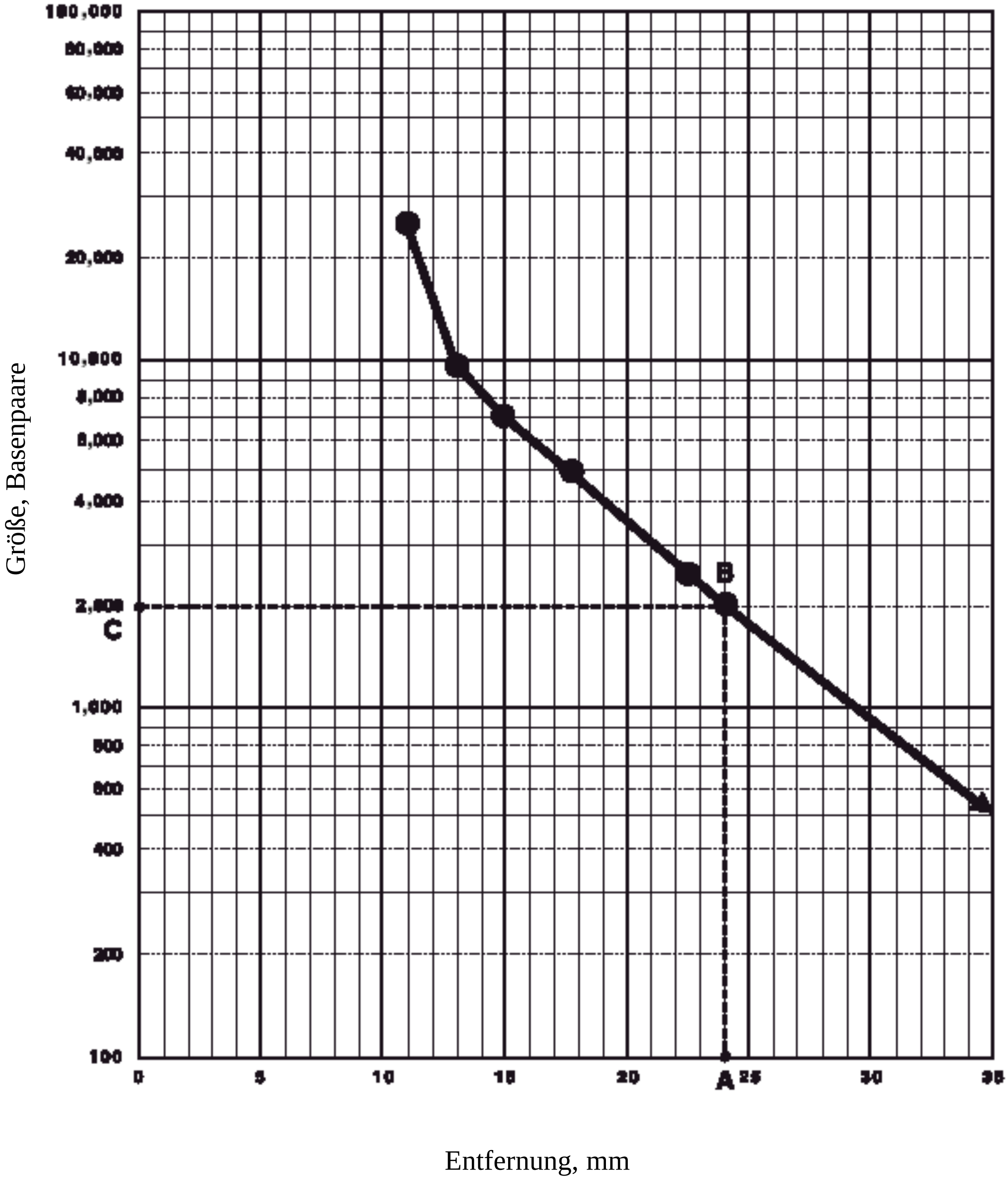
9. Welche Schlußfolgerungen bezüglich der DNA-Proben in der Abbildung ziehen Sie auf Grund Ihrer Gelanalyse? Stammen irgendwelche Proben anscheinend aus der gleichen Quelle? Wenn ja, welche? Erläutern Sie Ihre Schlußfolgerung.

   Die DNA in den Bahnen 2 und 4 (TO und V2) stammen von ein und demselben Individuum, da sie identische Restriktionsschnittstellen besitzt, die zu identischen Fragmenten führen.

	Bande	1	2	3	4	5	6
Lambda/*Hind*III Größenmarker	Abstand (mm)	11,0	13,0	15,0	18,0	23,0	24,0
	Reelle Größe (Bp)	23,130	9,416	6,557	4,361*	2,322	2,027
Tatort	Abstand (mm)	19,0	20,5	32,0			
	Größe ca. (Bp)	3,679	2,860**	828			
Verdächtiger 1	Abstand (mm)	21,0	23,5	30,5			
	Größe ca. (Bp)	2,860**	1,199	941			
Verdächtiger 2	Abstand (mm)	21,0	25,0	28,5			
	Größe ca. (Bp)	2,860**	1,700	1,159			
Verdächtiger 3	Abstand (mm)	19,0	20,5	32,0			
	Größe ca. (Bp)	3,679	2,860**	828			
Verdächtiger 4	Abstand (mm)	21,0	29,5				
	Größe ca. (Bp)	2,860**	1,093				
Verdächtiger 5 ***	Abstand (mm)	21,0	24,0	29,5			
	Größe ca. (Bp)	2,860**	1,986	1,093			

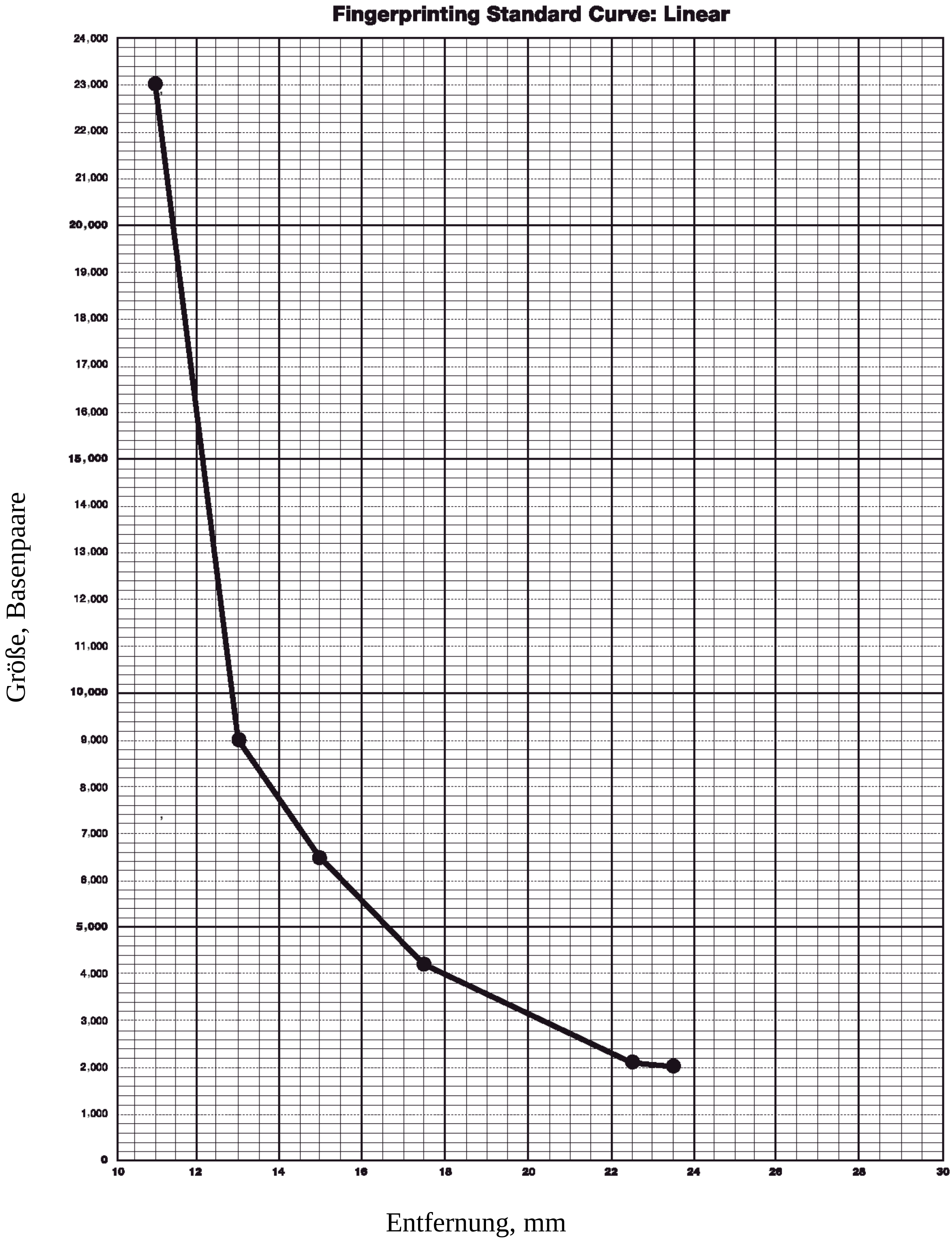
* Dieses Fragment kann schwach erscheinen, wenn die Marker nicht auf 65°C erhitzt wurden. Der Lambda *Hind*III Verdau erzeugt auch Banden mit 564 und 125 Bp die normalerweise zu schwach sind um auf dem Gel sichtbar zu sein.
** Die gemessene Wanderungsstrecke dieser Banden variiert in Abhängigkeit der Dicke der Banden, vgl. Anhang D um zu verstehen, warum die Banden in V4 und V5 so intensiv sind.
*** Die V4 und V5 DNA Bahnen können auch eine sehr schwache Bande von 500 Bp enthalten.

DNA Standard-Laufstrecken der Banden



Zur Abschätzung der Größe eines Fragments, das von der unbekannten DNA am Tatort oder der eines Tatverdächtigen stammt, muss zunächst die Wanderungsstrecke dieses spezifischen Fragments bestimmt werden. Tagen Sie diese Strecke auf der X-Achse der Standardkurve ein. Nehmen wir einmal an, die 2. Bande des Tatverdächtigen Nr. 5 sei 24 mm gewandert (A). Gehen Sie von der 24 mm Marke auf der X-Achse senkrecht nach oben zur Standardkurve und markieren Sie die Schnittstelle mit der Standardkurve durch einen schraffierten Kreis (B). Zeichnen Sie durch diese Schnittstelle eine Waagrechte bis zur Y-Achse, dieser Wert entspricht der ungefähren Größe des Fragments (C). Die 2. Bande des Tatverdächtigen 5 hat demnach ungefähr die Größe von 2000 Bp. Wiederholen Sie dieses Verfahren für alle Fragmente der DNA vom Tatort und der Tatverdächtigen. Tragen Sie die ungefähren Fragmentgrößen in die Datentabelle ein.

Fingerprinting Standard Kurve: Linear



4. Stunde Analyse der DNA-Bandenmuster
Abschlußfragen

1. Was soll hier bestimmt werden? Formulieren Sie noch einmal unsere zentrale Frage.

   Es wird versucht zu bestimmen, ob die DNA, die wir erhalten haben, von ein und demselben Individuum stammt oder von verschiedenen.

2. Welche der DNA-Proben sind fragmentiert worden? Wie würde das Gel aussehen, wenn keine Fragmentierung stattgefunden hätte?

   Die Anzahl der Fragmente wird von Fall zu Fall verschieden sein. Falls die DNA nicht hydrolysiert wurde, enthält jede Bahn nur eine Bande.

3. Wodurch wurde die DNA fragmentiert?

   Durch die hinzugefügten Restriktionsenzyme.

4. Wovon hängt es ab, an welcher Stelle eine Restriktionsendonuklease ein DNA-Molekül schneidet?

   Eine spezifische Basensequenz auf der DNA, die Restriktionsstelle genannt wird.

5. Eine Restriktionsendonuklease „schneidet" zwei DNA-Moleküle an der gleichen Stelle. Was haben diese beiden Moleküle an dieser Stelle demnach gemeinsam?

   Die Restriktionsstellen sind identisch.

6. Sieht es so aus, als hätte die DNA von irgendeinem Tatverdächtigen *Eco*RI oder *Pst*I Erkennungsstellen an derselben Stelle auf dem Molekül wie die DNA vom Tatort?

   Die Proben in den Bahnen 2 und 5 haben ein identisches Bandenmuster (TO und V3).

7. Sieht es aufgrund der obigen DNA-Sequenzanalyse so aus, als stamme die DNA von einem der Tatverdächtigen und die vom Tatort vom gleichen Individuum? Beschreiben Sie die wissenschaftliche Unterlage, auf die sich Ihre Schlußfolgerung stützt.

   Die Proben TO und V3 scheinen identisch zu sein. Beide ergeben auf dem Gel ähnliche Bandenmuster.

Vorbereitung auf die 1. Laborstunde (von Anhang B)

Betrachten Sie die linearen Basensequenzen (**A**s, **T**s usw.) auf beiden Strängen:

- Beschreiben Sie alle Muster, die Sie in der oberen Basensequenz erkennen.

  In der obigen Basensequenz ist kein spezifisches Muster erkennbar.

- Vergleichen Sie die Basen im oberen Teil des Molekül mit denen im unteren Teil. Beschreiben Sie alle Beziehungen, die Sie erkennen können.

  A ist immer mit T gepaart, G immer mit C.

Betrachten Sie die obere Basensequenz und vergleichen Sie sie mit der unteren. Erkennen Sie eine Gruppierung von Basen, bei der beim Lesen nach rechts bzw. nach links die Basen in derselben Reihenfolge erscheinen?

CTTAAG

Ein Restriktiosenzym hat die DNA in einem GAATTC Palindrom zwischen dem G und dem A geschnitten.
- Wie viele Basenpaare befinden sich links vom „Schnitt"?

  4

- Wie viele Basenpaare befinden sich rechts vom „Schnitt"?

  10

- Zählt man die Anzahl der Basenpaare; ist dann das rechte Fragment genauso groß wie das linke?

  Nein, es ist größer.

- Wie können Sie die Fragmentgröße in Bezug auf die Anzahl der im Fragment enthaltenen Basenpaare beschreiben?

  Fragment 1 ist ein 4 Bp Fragment
  Fragment 2 ist ein 10 Bp Fragment

Wenn das **GAATTC** Palindrom viermal auf demselben Stück DNA wiederholt wird und das Restriktionsenzym, das diese Basenpaare erkennt, vorhanden ist
- Wie viele DNA-Fragmente werden entstehen?

  5

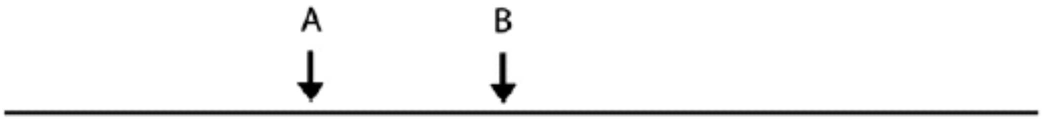
- Wird das **GAATTC** Palindrom in willkürlichen Abständen entlang des DNA Stranges wiederholt, welche Aussage können Sie dann über die Größe der entstehenden Fragmente machen?

  Die Größe der Fragmente wird auch zufällig sein.

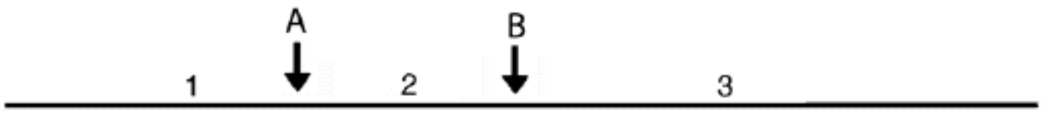
Anwendung des Erlernten:

- Besitzt ein DNA-Molekül die Restriktionsstellen A und B für ein bestimmtes Palindrom, wie viele Fragmente werden entstehen?

  3



- Numerieren Sie jedes Fragment.



- Welches Fragment wäre das größte?

  Fragment 3

- Welches Fragment wäre das kleinste?

  Fragment 2

- Zeichnen Sie ein DNA-Molekül, das für ein spezifisches Palindrom in willkürlichen Abständen 5 Restriktionsstellen besitzt. Wie viele Fragmente würden entstehen, wenn jede Restriktionsstelle von einem Restriktionsenzym gespalten wird?

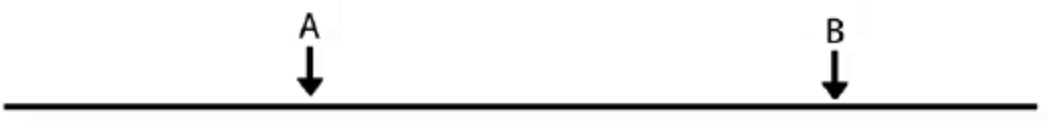
  Verschiedene Antworten sind möglich

- Numerieren Sie alle Fragmente.

  Verschiedene Antworten sind möglich

- Listen Sie sie der Größe nach auf. (das größte Fragment zuerst).

  Verschiedene Antworten sind möglich



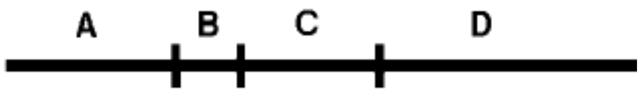
In diesem Diagramm stehen A und B für unterschiedliche Palindromsequenzen auf einem DNA-Strang. Es ist nur das Restriktionsenzym vorhanden, das die Restriktionsstelle B erkennt.

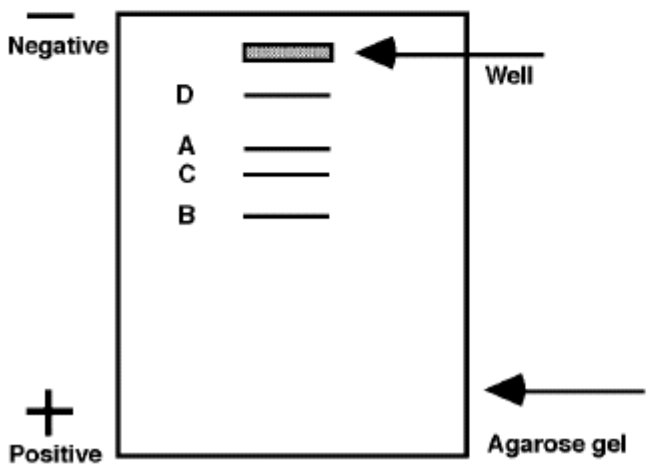
- Erklären Sie, warum nur zwei Fragmente entstehen würden.

  Das Enzym würde an der Stelle B schneiden und daher 2 DNA-Fragmente erzeugen.

Vorbereitung auf die 2. Laborstunde: Überblick über die Elektrophorese

Ein lineares Stück DNA wird, wie unten gezeigt in 4 Fragmente geschnitten. Eine Lösung mit den 4 Fragmenten wird in eine Starttasche eines Agarosegels pipettiert. Zeichen Sie auf der rechten Seite ein, was Sie aufgrund der obigen Informationen bezüglich der Auftrennung der Fragmente erwarten. Markieren Sie jedes Fragment mit dem ihm zugehörigen Buchstaben.





- Lassen Sie die Lehrkraft das Diagramm überprüfen, bevor Sie fortfahren.

- Wo würden sich die größeren Fragmente – die mit der größeren Anzahl an Basenpaaren befinden: mehr im oberen oder mehr im unteren Teil des Gels? Warum?

  Die großen Fragment würden sich mehr am oberen Ende des Gels befinden, weil es für die größeren Fragmente schwieriger ist, durch das Gel zu wandern.

- Angenommen, Sie hätten von allen vier Fragmenten je 500 Stück, wie würde in diesem Fall das Gel aussehen?

  Es wären trotzdem nur 4 Banden zu sehen.

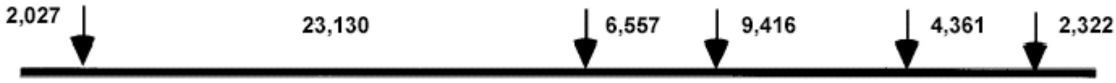
- Wenn es möglich wäre, jedes Fragment zu wiegen, welches Fragment wäre das schwerste? Warum?

  Fragment D wäre das schwerste, weil es aus dem größten Stück DNA besteht und daher die größte Masse hätte.

- Vervollständigen Sie diese Regel zur Wanderung der DNA-Fragmente durch ein Agarosegel:

  Je größer die DNA-Fragmente, desto langsamer wandert es durch ein Agarosegel.

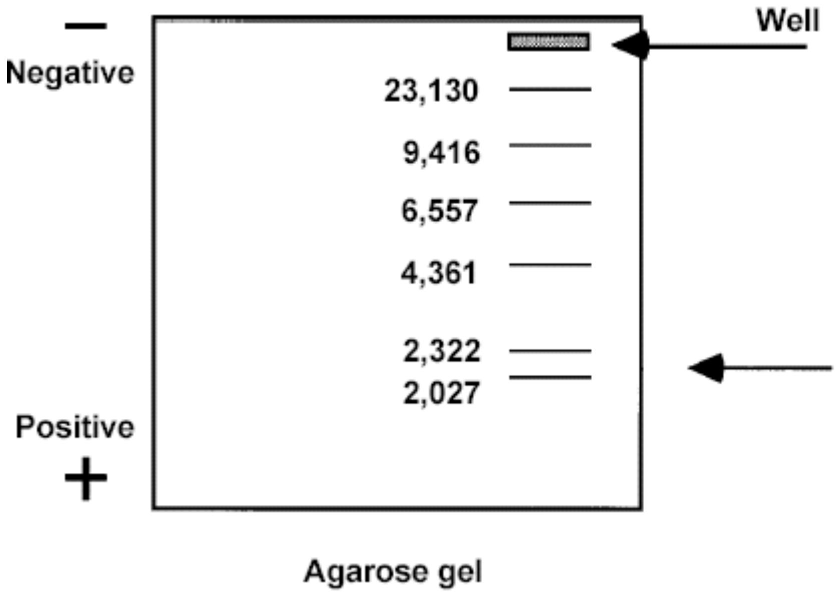
Dieses Diagramm stellt ein Stück DNA dar, das mit *Hind*III an allen durch die Pfeile gekennzeichneten Restriktionsstellen geschnitten wird. Die Zahlen geben die Anzahl der in jedem Fragment 5 vorhandenen Basenpaare an.



∞ Wieviele Fragmente werden durch das Restriktionsenzym *Hind*III produziert?

6

Zeichnen Sie in dem unten abgebildeten Gel die Fragmente an den Stellen ein, an denen sie sich Ihrer Meinung nach am Schluß der Elektrophorese befinden.



∞ Beschriften Sie jedes Fragment mit seiner korrekten Anzahl an Basenpaaren

Anhang D: Plasmid-DNA und Restriktionsenzyme

Die DNA-Proben vom Tatort und der Verdächtigen, die in diesem Kit enthalten sind, enthalten keine menschliche DNA, sondern Plasmid-DNA, die aus Bakterien isoliert wurde. Plasmide sind kleine, ringförmige DNA-Stücke, die sich in Bakterienzellen vermehren können. In der Evolution entwickelten Bakterien Plasmide, die Gene enthielten, die es ihnen ermöglichten, Antibiotika, die von anderen Mikroorganismen entwickelt wurden, zu überleben. Diese Resistenz gegen Antibiotika verschaffte den Bakterien mit Plasmiden einen selektiven Vorteil gegenüber ihren Konkurrenten. Bakterien waren in der Lage über Konjugation die vorteilhafte Plamid-DNA anderen Bakterien weiterzugeben.

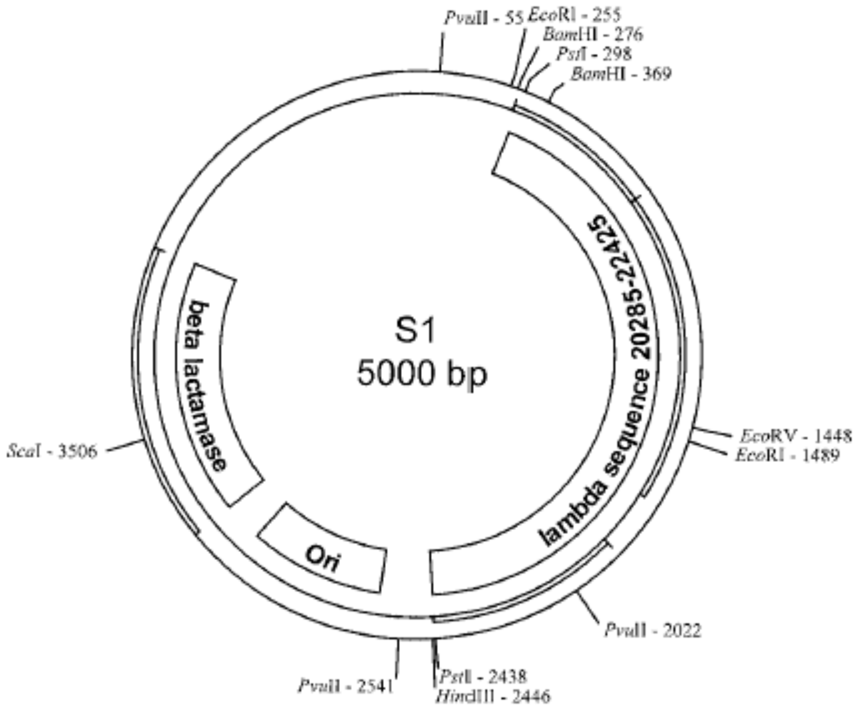
Für Wissenschaftler hat Plasmid-DNA den Vorteil, daß ihre geringe Größe die Aufreinigung erleichtert und daß sie mit Hilfe eines Transformation genannten Prozesses wieder in Bakterienzellen eingeführt werden kann. Die Wissenschaftler haben auch von einem anderen natürlichen Verteidigungsmechanismus der Bakterien profitiert: dem Restriktionsenzym. Bakterien entwickelten Enzyme, um injizierte DNA von Viren oder Bakteriophagen zu zerstören. Restriktionsenzyme erkennen spezifische DNA-Sequenzen auf der Phagen-DNA und schneiden dann die DNA an dieser Stelle. Die fragmentierte Phagen-DNA stellt dann keine Bedrohung mehr für die Bakterien dar. Sind sie einmal im Labor aufgereinigt, werden diese Restriktionsendonukleasen (Nuklease = Enzym, das schneidet, endo = innerhalb, Nukleinsäuren) nach dem Bakterium benannt, aus dem sie isoliert wurden. Zum Beispiel wurde *Eco*RI aus *Escherichia coli* isoliert. Aufgereinigte Restriktionsenzyme können dann im Labor eingesetzt werden, um DNA aus irgendeiner Quelle an eindeutig vorhersehbaren Stellen zu schneiden.

Nachdem Plasmide mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, können sie mit fremder DNA aus beliebiger Quelle verbunden werden, die mit dem gleichen Enzym geschnitten wurde. Die daraus entstandene Hybrid-DNA kann dann in Bakterienzellen transformiert werden. Die Hybrid Plasmide können sich selbst wie vorher in Bakterienzellen vermehren, mit der Ausnahme, daß fremde DNA mit angehängt wurde, die nun mit vermehrt wird. Jedes Hybrid Plasmid enthält nun eine vollständige Kopie des Stückes fremder DNA, das eingesetzt wurde. Man sagt, das fremde DNA-Stück wurde geklont und die Plasmid-DNA, mit der sie verbunden ist, heißt Vektor.

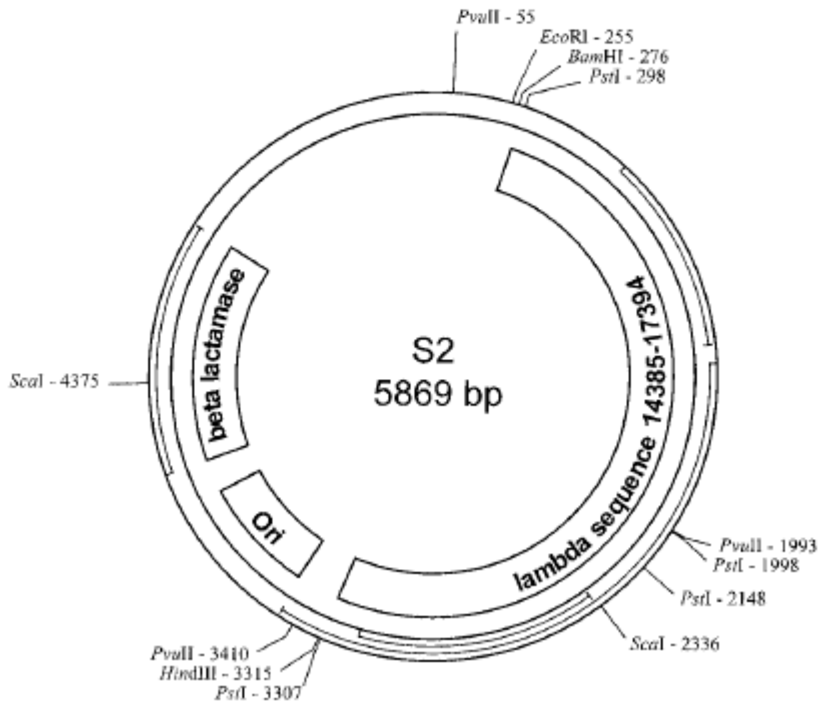
Die DNA-Proben vom Tatort und von den Verdächtigen, die in diesem Kit enthalten sind, entstanden, indem DNA des Bakteriophagen Lambda, die *Pst*I verdaut wurde, mit dem *Pst*I verdauten Plasmid Vektor pTZ18U verbunden wurde. Es wurden die rekombinanten Plasmide ausgewählt, die ein speziell zutreffendes Bandenmuster aufweisen oder RFLPs (Restriktions Längen Polymorphismus) nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen PstI und EcoRI und der Analyse mittels Agarosegelen.

Komplette Restriktionskarten von jedem Plasmid des Tatorts oder der Verdächtigen, der Vektor pTZ18U und der Spender Phage Lambda sind angefügt zur weiteren Diskussion und Untersuchung im Klassenzimmer. Versuchen Sie Folgendes: Geben Sie die Zahl an Basenpaaren in den S4 und S5 Plasmiden an, basierend auf den Ergebnissen Ihrer Gele. Wie lassen sich diese Größen vergleichen mit der Anzahl an Basenpaaren, die in den Plasmidkarten von S4 und S5 angegeben werden? Wie können Sie die Abweichung erklären? Wie können Sie zu einer genaueren Abschätzung der Plasmidgrößen kommen, unter Verwendung von Restriktionsanalyse und Agarose Elektrophorese? (Hinweis: Vielleicht führen andere Restriktionsenzyme zu anderen Bandenmuster auf dem Gel.) Welche Enzyme würden Sie auswählen?

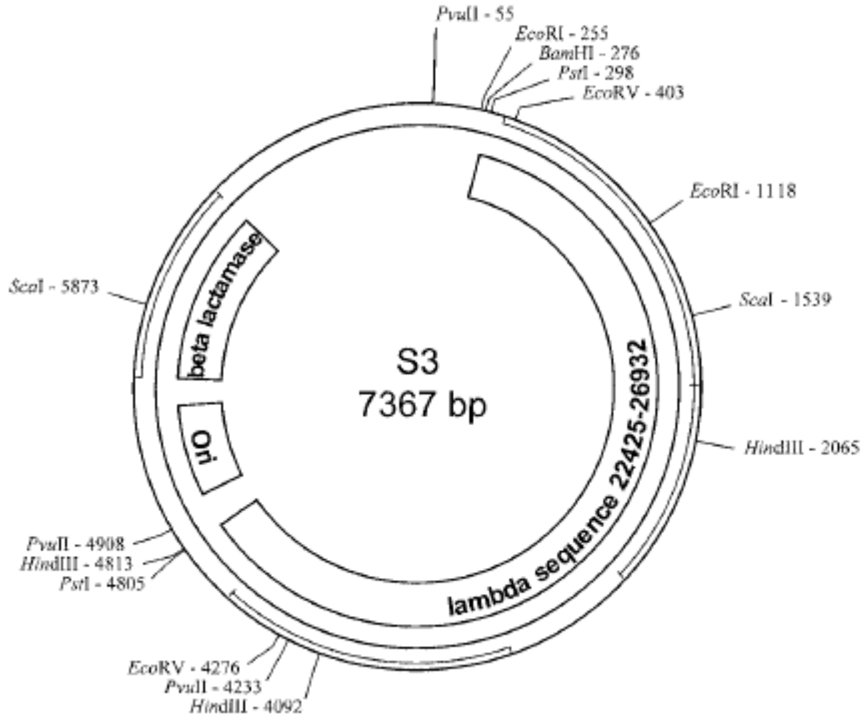
Plasmid-Karten:



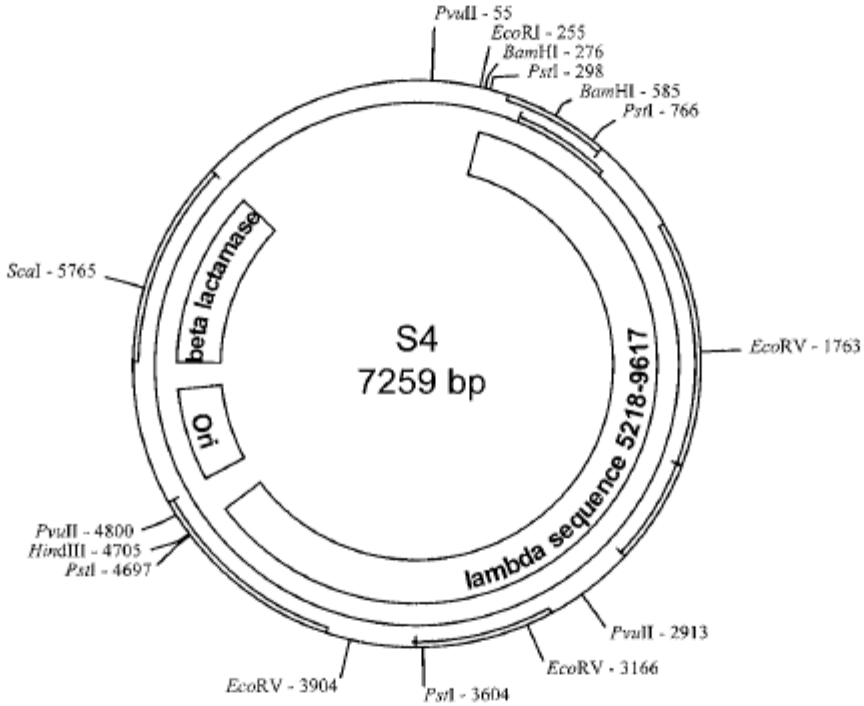
Verdächtiger 1- DNA-Probe



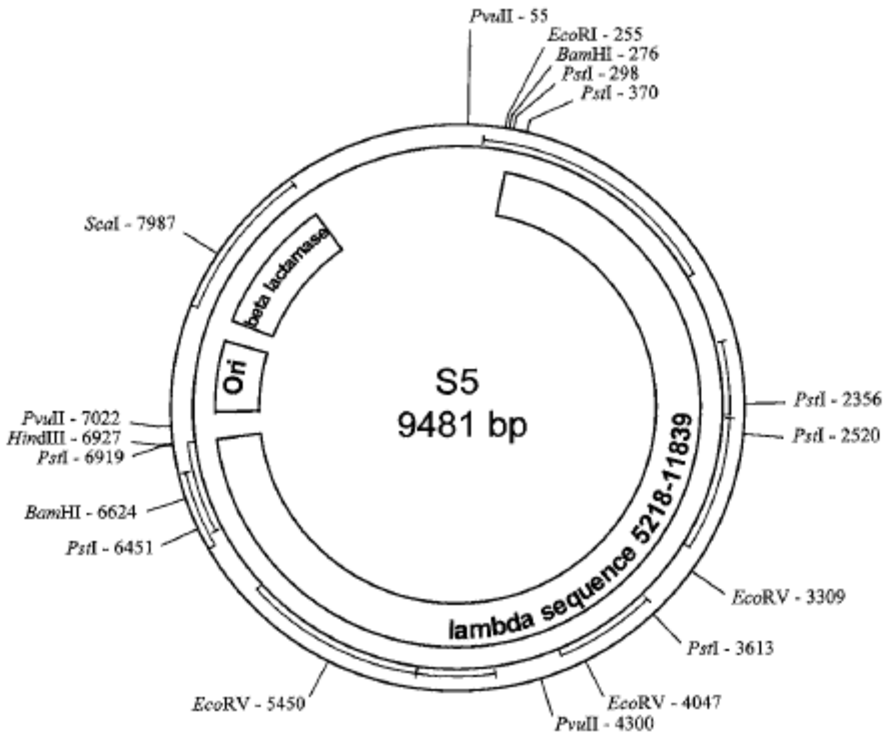
Verdächtiger 2- DNA-Probe



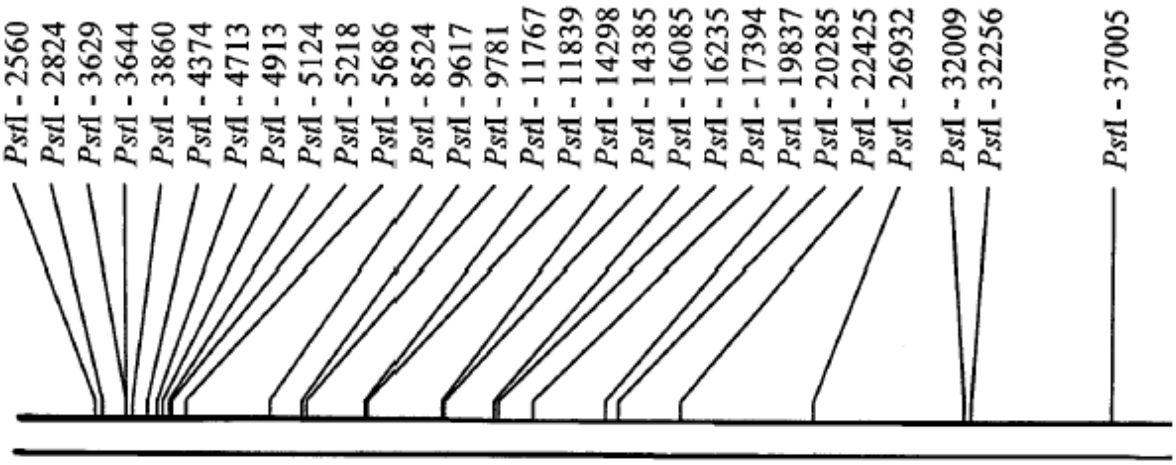
Tatort/Verdächtiger 3 - DNA-Probe



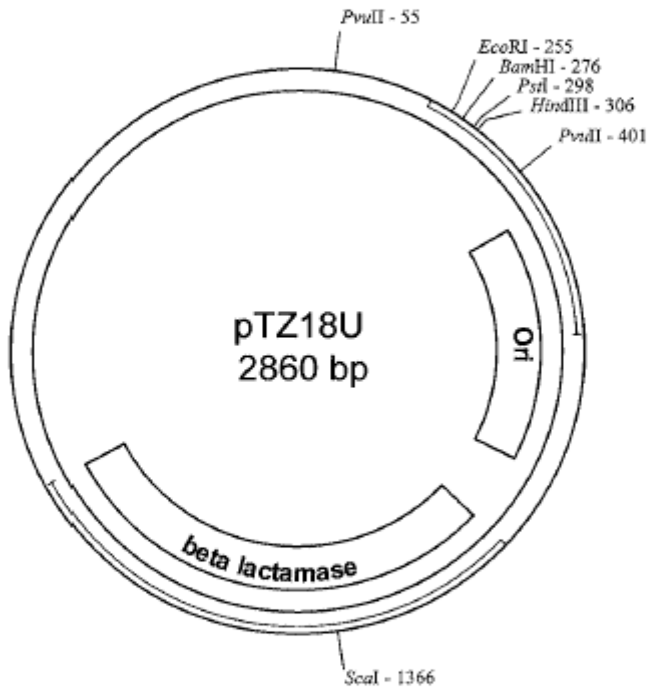
Verdächtiger 4 - DNA-Probe



Verdächtiger 5 - DNA-Probe



Lambda – Bakteriophagengenom
48502 bp



Plasmid - Elternvektor

Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com **USA** (800) 4BIORAD **Australia** 02 9914 2800 **Austria** (01)-877 89 01 **Belgium** 09-385 55 11 **Brazil** 55 21 2527 3454
Canada (905) 712-2771 **China** (86-21) 63052255 **Czech Republic** + 420 2 41 43 05 32 **Denmark** 44 52 10 00 **Finland** 09 804 22 00
France 01 47 95 69 65 **Germany** 089 318 84-0 **Hong Kong** 852-2789-3300 **Hungary** 36 1 455 8800 **India** (91-124)-6398112/113/114, 6450092/93
Israel 03 951 4127 **Italy** 39 02 216091 **Japan** 03-5811-6270 **Korea** 82-2-3473-4460 **Latin America** 305-894-5950 **Mexico** 55-52-00-05-20
The Netherlands 0318-540666 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 23 38 41 30 **Poland** + 48 22 331 99 99 **Portugal** 351-21-472-7700
Russia 7 095 721 1404 **Singapore** 65-6415 3188 **South Africa** 00 27 11 4428508 **Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 08 555 12700
Switzerland 061 717-9555 **Taiwan** (8862) 2578-7189/2578-7241 **United Kingdom** 020 8328 2000

0104 Sig 1103

4006096 Rev F